



Titre: Thérapie laser assistée par nanoparticules plasmoniques du
Title: rétinoblastome

Auteur: Cécile Darviot
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Darviot, C. (2018). Thérapie laser assistée par nanoparticules plasmoniques du
Citation: rétinoblastome [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].
PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3768/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3768/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Michel Meunier, & Pierre Hardy
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

THÉRAPIE LASER ASSISTÉE PAR NANOPARTICULES PLASMONIQUES DU
RÉTINOBLASTOME

CÉCILE DARVIOT
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)
DÉCEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

THÉRAPIE LASER ASSISTÉE PAR NANOPARTICULES PLASMONIQUES DU
RÉTINOBLASTOME

présenté par : DARVIOT Cécile

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GODBOUT Nicolas, Ph. D., président

M. MEUNIER Michel, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. HARDY Pierre, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. PROVOST Jean, Ph. D., membre

DÉDICACE

À Pap' Yves.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux co-directeurs de recherche, le Pr Meunier et le Dr Hardy pour m'avoir donné la chance de travailler sur un projet aussi intéressant que celui du traitement du rétinoblastome, me permettant ainsi de découvrir le monde du biomédical.

J'aimerais également remercier Nasr Tabatabei pour m'avoir épaulée à mes débuts en matière de culture cellulaire, et Carmen Gagnon, du laboratoire du Dr Hardy à l'hôpital Sainte Justine, pour sa grande disponibilité. Un immense merci également à Lu Wang pour la synthèse de nanoparticules, à Sergiy Patskovsky pour ses conseils aussi tranchants qu'avisés, à Yves Drolet pour son humour et son aide précieuse et à tout le reste de l'équipe : Leonidas, Mengjiao, Jennyfer, Audrey et Isabelle pour être une gang aussi enjouée et réconfortante.

RÉSUMÉ

Le rétinoblastome (RB), qui touche environ 1 enfant sur 18 000 est le cancer infantile le plus fréquent. Il existe sous forme héréditaire, avec un risque accru de bilatéralité, ou sporadique et est lié à des mutations du gène Rb. Bien que les chances de survie soient très élevées dans les pays dits développés, il n'est pas rare que la solution finale pour l'éradication du cancer soit l'énucléation, autrement dit le retrait de l'oeil. En effet, parmi les stades de développement de la tumeur, qui naît initialement à la surface de la rétine, on compte l'essaimage de la tumeur vers la partie centrale de l'oeil, le corps vitré. Les cellules tumorales prennent alors une nature flottante et leur éradication en devient d'autant plus compliquée. Si initialement des traitements de cryothérapie et thermothérapie peuvent être utilisés, le seul traitement admissible à ce stade est la chimiothérapie intravitréenne. L'humeur vitrée, principalement composée de collagène et d'acide hyaluronique, présente une forte viscosité et rend plus difficile le ciblage des tumeurs par les médicaments. C'est ainsi que, pour éviter l'envahissement du cerveau par le nerf optique, enlever l'oeil paraît une solution tout à fait préférable. Comme alternative aux traitements chimiothérapeutiques usuels, souvent lourds en effets secondaires, nous proposons ici une preuve de concept pour le traitement laser assisté par nanoparticules plasmoniques du rétinoblastome. Cette méthode présente l'avantage de produire une très forte augmentation de température hautement localisée, permettant de tuer les cellules cancéreuses sans affecter les tissus alentour. Bien que l'interaction laser-nanoparticules ait fait l'objet de beaucoup de recherche pour des applications dans le domaine médical, on ne retrouve qu'étonnamment peu de cas appliqués au traitement du cancer dans l'oeil. Les cellules Y79 utilisées pour l'étude, de par leur nature flottante, apportent de nouveaux enjeux à la démonstration *in vitro*. Ayant une forte tendance à former des amas cellulaires elles apportent en effet une structure tridimensionnelle à l'étude. Dans un premier temps, afin de simplifier le système étudiées les cellules seront artificiellement attachées au fond des pétris à l'aide d'un polymère. Les utilisations de deux types de lasers seront comparées, ainsi que différents paramètres tels que la fluence laser, la concentration en nanoparticules, le temps d'irradiation et le taux de re-prolifération cellulaire 18h après irradiation. Dans un deuxième temps, afin de se rapprocher des conditions réelles, un simili-vitré constitué d'acide hyaluronique et de milieu de culture cellulaire est réalisé et le traitement est mené directement sur les amas cellulaires. Nous avons ainsi pu montrer que, malgré la viscosité, les nanoparticules se rendaient jusqu'au coeur des amas. En utilisant un laser pulsé nanoseconde et des nanoparticules d'or de 100nm, nous sommes parvenus à un taux de mort cellulaire d'environ 80% pour une fluence d'irradiation de $0,2\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ dans le simili-corps vitré.

ABSTRACT

The retinoblastoma (RB), an infantile eye cancer, concerns 1 of 18 000 births and is usually diagnosed before 6 years old. It exists under two forms, hereditary or sporadic, and is linked with the Rb gene mutation. Two stages are described in the literature. At the beginning, the tumor grows on the retina. At this stage, the usual treatments, depending on the tumor size, are cryotherapy or surgery complemented with localized chemotherapy. Then the tumor detaches from the retina and starts floating in the vitreous. The viscosity of the vitreal chamber prevents any surgery and the only possible treatment is chemotherapy. Moreover, at this step, the risk of migration towards the brain is highly increased. Unfortunately, to avoid dramatic complications, enucleation is often the best option. As an alternative and efficient localized therapy, we have investigated laser induced plasmon-mediated hyperthermia which offers the advantage of producing a highly localized heat increase of the cancer cells, thus killing these cells by avoiding any side effects on healthy tissues. This work aims to establish a proof of concept for in vitro treatment of RB cells with nanosecond laser and 100nm spherical gold nanoparticles (SNG) and extend this new therapy to phantom reproducing vitreous of the eye. Nanosecond laser surgery, assisted by plasmonic effect from gold nanoparticles have been investigated in numerous cases of cancers. However, the Y79 cells, which are floating cells, bring new issues for in vitro studies: it adds a new dimension as they naturally grow in 3D clusters. The first study is performed by artificially attaching the cells to the petri-dishes with poly-L-lysine and the dead cells are counted with PI fluorescence. Furthermore, dead cells 18h and 24h hours after irradiation were evaluated in order to estimate the re-proliferation after treatment. In vitro studies were performed by varying different parameters such as the laser power, the exposure time to laser irradiation per cell and the concentration of nanoparticles. To mimic the eye, we are artificially fabricating a phantom of the vitreous in which RB cells are cultured. The vitreous is mainly composed of water (98%), hyaluronan, collagen and proteins. The hyaluronan, a polymer naturally present under different sizes in the eye, has been chosen to mimic the vitreous. The obtained gel was characterized by measuring its viscosity to validate the model. Cellular growth rate and cells distribution were obtained and compare to those from conventional culture medium. We have verified that the nanoparticles can reach their target RB cells in this phantom and that we can kill up to 80% of Y79 cells with a $0,2\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ irradiation. Furthermore, we noticed that viscosity of the surrounding medium has increased the efficiency of the treatment.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
LISTE DES ANNEXES	xv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 L’oeil et le rétinoblastome	5
2.1.1 L’oeil chez l’enfant	5
2.1.2 Signes cliniques et occurrence du rétinoblastome	9
2.1.3 Traitements actuels du rétinoblastome	10
2.1.4 Traitements en cours d’investigation	12
2.2 Traitements au laser dans l’oeil	13
2.2.1 Thérapie photodynamique	13
2.2.2 Photocoagulation	14
2.2.3 Photoablation	14
2.2.4 Vitréolyse	15
2.3 Nanoparticules plasmoniques et interaction avec la lumière	15
2.3.1 Propriétés optiques des nanoparticules plasmoniques	15
2.3.2 Interaction avec un faisceau laser émettant des impulsions brèves	16
2.4 Nanoparticules plasmoniques et traitement du cancer	19
2.4.1 Transport de médicaments	19

2.4.2	Transfection	20
2.4.3	Hyperthermie	21
2.4.4	Cas du rétinoblastome	21
CHAPITRE 3 TRAITEMENT IN VITRO DU RETINOBLASTOME PAR HYPER-		
	THERMIE	24
3.1	Présentation de la lignée cellulaire et du matériel utilisé	24
3.1.1	Lignée cellulaire Y79	24
3.1.2	Nanoparticules utilisées	24
3.1.3	Préparation des échantillons	25
3.1.4	Montage expérimental et caractérisation du faisceau	26
3.1.5	Conditions d'irradiation et exploitation des résultats	27
3.2	Résultats	27
3.2.1	Toxicité des nanoparticules	27
3.2.2	Détermination de la concentration finale en NPs	29
3.2.3	Irradiation avec laser nanoseconde	30
3.2.4	Irradiation avec laser CW	34
CHAPITRE 4 REALISATION D'UN SUBSTITUT DU CORPS VITRÉ ET ÉTUDE		
	DE FAISABILITÉ DANS L'OEIL	37
4.1	Motivation et hypothèses	37
4.2	Caractérisation du substitut du corps vitré	37
4.2.1	Propriétés rhéologiques	37
4.2.2	Croissance des cellules dans le simili corps vitré	37
4.2.3	Incubation des NPs avec les amas cellulaires dans le simili-corps vitré	38
4.3	Résultat de l'irradiation de cellules Y79 dans un environnement visqueux	38
4.3.1	Préparation des échantillons et méthode	38
4.3.2	Irradiation pour différentes concentrations en acide hyaluronique	39
4.3.3	Irradiation dans un volume	39
CHAPITRE 5 DISCUSSION		43
5.1	Discussion des résultats obtenus et de leur exportabilité vers un modèle <i>in vivo</i>	43
5.1.1	Influence de la viscosité	43
5.1.2	Choix des nanoparticules et fonctionnalisation	44
5.2	Comparaison avec la vitréolyse et considérations géométriques	44
CHAPITRE 6 CONCLUSION		46

6.1 Synthèse des travaux	46
6.2 Limitations de la solution proposée	46
6.3 Améliorations futures	47
RÉFÉRENCES	48
ANNEXES	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Évolution avec l'âge des grandeurs caractéristiques de l'oeil chez l'humain. Les distances indiquées sont prises dans le plan de coupe présenté à la figure 2.1, le long de l'axe optique et les valeurs sont issues de la littérature[1]. r_c est le rayon de courbure de la cornée.	5
Tableau 3.1	Nombre de NPs moyen par cellule en fonction de la concentration initiale en NPs, après 1h30 d'incubation. V_{NPs} est le volume ajouté, C_{NPs} la concentration en NPs après dilution et $N_{Av/Ap}$ le nombre moyen de nanoparticules par cellule avant et après centrifugation des échantillons à 200g pendant 7min.	29
Tableau 5.1	Liste des lentilles chirurgicales utilisable en fonction de l'emplacement des objets visés dans le vitré, Ocular Instruments, Bellevue.	45
Tableau A.1	Liste des paramètres employés dans le modèle et valeurs choisies . . .	58

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Schéma de l'oeil. Le trait pointillé représente l'axe optique. Les distances indiquées font référence aux valeurs du tableau 2.1	6
Figure 2.2	Représentation schématique du corps vitré[2]. Les fibres de collagène ont un diamètre estimé à 15nm environ,	8
Figure 2.3	Photographie d'un patient, atteint de rétinoblastome unilatéral. Un reflet blanchâtre est visible au niveau de la pupille de l'oeil droit. Source : National Cancer Institute, 1989.	10
Figure 2.4	Spectres bien distincts de nanoparticules d'alliage Or-Argent de différentes compositions. La photographie montre les solutions colloïdales correspondantes et fait apparaître les différences de lumière transmise[3].	17
Figure 2.5	Schéma représentant les différents états d'une nanoparticule d'or de 100nm en fonction de la température[4]. Changement d'états de l'eau (1 : Fusion, 2 : Vaporisation, 3 : Point critique, 4 : Point spinodal) et de l'or (5 : Fusion, 6 : Vaporisation, 7 : Point critique).	19
Figure 2.6	(A) Carte de l'interaction laser-tissu sans présence de nanoparticules. (B) Différents niveaux d'énergie nécessaires pour observer les mêmes effets avec (symboles pleins) ou sans nanoparticules (contours seuls). On constate que l'introduction de nanoparticules d'or permet d'abaisser les fluences nécessaires pour atteindre les mêmes régimes d'interaction[4].	20
Figure 2.7	Échelle de temps de stabilisation autour de différents objet, sous l'influence d'une irradiation laser[4]	22
Figure 3.1	A - amas de cellules Y79 en suspension dans leur milieu de culture B - cellules Y79 artificiellement attachées avec la poly-L-lysine.	25
Figure 3.2	Spectres d'extinction des nanoparticules d'or et d'alliage utilisées. La flèche en haut indique la longueur d'onde d'irradiation du laser. . . .	26
Figure 3.3	Montage expérimental. Un miroir amovible permet d'échanger facilement le laser nanoseconde contre le laser continu. Les polariseur/analyseur, l'obturateur et la platine du microscope sont contrôlés par ordinateur et synchronisés par un logiciel Labview.	28

Figure 3.4	A - Activité cellulaire après 24h d'incubation avec différentes concentrations de AuNPs 100nm, sans irradiation laser. L'activité cellulaire est normalisée par rapport au contrôle (\emptyset NPs) ; B - Images SEM d'une cellule morte surchargée de nanoparticules (haut) et d'une cellule vivante (bas) après le même temps d'incubation avec des NPs. Les sphères blanches visibles à la surface des cellules sont des nanoparticules d'or de 100nm.	28
Figure 3.5	Influence de la puissance d'irradiation sur la mortalité cellulaire, A - cellules mortes marquées au PI (en rouge), 4X-0,1NA ; B - mortalité cellulaire 10 min après l'irradiation laser, pour deux types de nanoparticules et sans nanoparticules (contrôle). Test ANOVA One-Way, avec correction de Bonferroni : ** $p < 0,01$ et * $p < 0,5$	31
Figure 3.6	Aspect de la membrane cellulaire avant (A et C) et après irradiation (B et D), 60X-1,27NA. La microscopie en champ clair permet de visualiser les cellules (A et C) tandis que grâce à la rétro diffusion de la lumière, les nanoparticules AuNPs 100nm sont observables par microscopie optique (C et D).	32
Figure 3.7	Influence de la concentration de NPs. L'irradiation a été menée avec une puissance moyenne de $50\mu W/\mu m^2$	33
Figure 3.8	A - Pourcentage de cellules vivantes 10 min et 18h après irradiation (rapporté au nombre de cellules vivantes à $t=0$) B - Prolifération cellulaire (%) 18h après irradiation pour différentes puissances moyennes de laser.	34
Figure 3.9	Carte de l'influence du temps d'irradiation et de la puissance surfacique du laser sur l'induction de la mort cellulaire. Les pourcentages indiqués représentent le % de cellules mortes atteint au sein de l'échantillon. Dans chaque tableau, de haut en bas, l'irradiation a été effectuée pour des temps décroissants d'exposition au faisceau laser. De gauche à droite la puissance utilisée augmente.	36
Figure 4.1	Mesures de viscosité pour différentes concentrations d'acide hyaluronique. Ces résultats sont comparables aux mesures de viscosité faites dans le vitré par Silva et al.[5]	38
Figure 4.2	Étude de prolifération des cellules dans le gel sur 48h. Normalisation par rapport au contrôle (RPMI).	39

Figure 4.3	Extrait du balayage en z d'un amas cellulaire décoré de nanoparticules, la barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$. Les images sont à lire dans le sens indiqué en haut à gauche de la figure, chaque image (plan xy) correspondant à une nouvelle valeur de z espacée de $10\mu\text{m}$ de la précédente. Les cellules apparaissent en bleu violacé (indigo) et les nanoparticules en magenta. L'amas total s'étale sur une cinquantaine de micromètres	40
Figure 4.4	Influence de la concentration en acide hyaluronique A - différentes viscosités de gel, irradiation à $25\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$, B - Comparaison avec les résultats obtenus dans le milieu de culture seul.	41
Figure 4.5	A - Irradiation des cellules Y79 en suspension dans un volume pour une puissance surfacique moyenne de $2\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$; B - Photographie des amas cellulaires pendant l'irradiation : la délimitation entre la zone non irradiée (haut) et la zone irradiée (bas) est très nette.	42
Figure A.1	Dépendance en température de la fonction diélectrique de l'or, partie réelle (gauche) et imaginaire (droite). La partie encerclée correspond au voisinage de la longueur d'onde de résonance d'une nanoparticule d'or de 100nm.	59
Figure A.2	Déplacement théorique du pic plasmon d'une nanoparticule d'or de 100nm dans l'huile, pour différentes températures à la surface de la nanoparticule.	60
Figure A.3	Déplacement du pic plasmon observé pour des nanoparticules de 100nm dans l'huile, comparé aux valeurs théoriques, pour différentes puissances d'irradiation avec un laser CW.	61

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

RB	Rétinoblastome
NP	Nanoparticule
NS	Nanoshell (nanoparticule de type coeur-couronne)
CW	Continuous Wave
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
PI	Propidium Iodine
SEM	Scanning Electron Microscopy

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	ESTIMATION DE LA TEMPERATURE AUTOUR D'UNE NANO-PARTICULE LORS DE L'IRRADIATION LASER CW	57
Annexe B	IMAGERIE TRIDIMENSIONNELLE D'UN AMAS CELLULAIRE APRÈS IRRADIATION	62

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le rétinoblastome (RB) est un cancer infantile, pouvant se développer *in utero*, et généralement diagnostiqué avant l'âge de 6 ans. Il s'agit du cancer intraoculaire le plus fréquent chez l'enfant et touche environ 1 enfant sur 18 000. S'il est détecté suffisamment tôt, le rétinoblastome est fortement curable (90% de chances), mais il subsiste souvent des séquelles relativement importantes[6]. Par ailleurs, les chances de d'éradication du cancer sont fortement dépendantes du pays et de la facilité à accéder aux soins. Ce cancer provient d'une mutation génétique qui affecte la protéine Rb, responsable de l'inhibition de la croissance de la rétine. Cette protéine étant rendue inactive, elle permet le développement d'une tumeur, appelée rétinoblastome. Il existe deux formes de rétinoblastomes, l'une héréditaire et l'autre non (environ 60% des cas). Il est à noter que la forme héréditaire présente le plus de risques d'affecter les deux yeux, à hauteur d'environ 36%[7]. L'indice le plus marquant du développement d'un rétinoblastome est l'apparition d'une leucocorie, tâche blanchâtre au centre de l'œil. Aujourd'hui, les traitements existant impliquent le plus souvent la chirurgie (allant parfois jusqu'à l'ablation de l'œil) et la chimiothérapie (carboplatine, topotécan...), par voie intraveineuse ou administrée directement dans les tissus qui entourent l'œil. Ces traitements ont des effets secondaires non négligeables sur la vision et l'organisme de manière générale. La radiothérapie, que ce soit par irradiation externe ou par l'apposition de disque d'iode 125, autrefois préconisée, est en net recul à cause de ses effets néfastes sur l'organisme. De nombreuses études prouvent en effet l'augmentation du risque de développer un défaut de croissance et/ou l'augmentation du risque de développer d'autres cancers dans le reste du corps chez les patients atteints de rétinoblastome de type héréditaire[8]. À un stade précoce de la maladie, on essaye parfois de réaliser une photocoagulation au laser, dans le but d'isoler la tumeur du système sanguin et limiter ainsi sa croissance. Des traitements à base de cryothérapie ou de thermo-chimiothérapie ont également été développés. Le type de traitement sera choisi en fonction de la taille de la tumeur, de son emplacement et de la qualité bilatérale ou unilatérale du rétinoblastome; le plus souvent, une combinaison de plusieurs techniques sera utilisée pour optimiser les chances d'éradication de la tumeur tout en limitant les effets secondaires [7, 8]. De nombreuses classifications ont ainsi été développées afin d'aider le médecin à choisir le traitement adéquat[9]. Comme dans la plupart des cancers, le principal enjeu est de réussir à enlever la totalité des cellules cancéreuses afin de minimiser le risque de développer une seconde tumeur. Néanmoins cette opération est rendue difficile par plusieurs facteurs, comme la diffusion de cellules cancéreuses hors de la tumeur et l'aspect hétérogène de la tumeur. Il existe en effet deux stades dans le développement du rétinoblastome. Initialement

la tumeur est collée sur la rétine mais il arrive, après un temps variable de développement, qu'elle se décolle de la rétine et vienne flotter dans la partie centrale et visqueuse de l'œil, appelée corps vitré. Ce phénomène est appelé essaimage vitréen et pose plusieurs difficultés supplémentaires. Tout d'abord, les traitements en cryothérapie et thermothérapie deviennent impossibles à mettre en place. La tumeur n'étant plus vascularisé, la photocoagulation devient également inutile. La chimiothérapie par injection intravitréenne reste possible mais moins efficace à cause de la viscosité du vitré, du faible temps de vie des médicaments, et de la difficulté à atteindre le centre des tumeurs. Le traitement ayant fait le plus de preuves jusqu'alors semble être l'utilisation combinée de 3 agents chimio-thérapeutiques qui sont le carboplatine, l'étoposide et le vincristine[7]. Les traitements complémentaires locaux auxquels on peut avoir recours sont essentiellement des traitements de radiothérapie, soit par irradiation externe, soit par disque d'iode (brachythérapie). L'ensemble de ces traitements, quoiqu'efficaces, sont très souvent accompagnés d'effets secondaires très néfastes pour le développement normal de la vision chez l'enfant. En effet, la cryothérapie et la thermothérapie sont reconnues pour laisser des cicatrices relativement importantes sur le tissu rétinien, tandis que la chimiothérapie et la radiothérapie sont soupçonnées d'encourager l'apparition de tumeurs secondaires après le traitement.

Les nanotechnologies, apparues vers les années 70, se sont rapidement développées et constituent aujourd'hui encore un marché en pleine croissance[10]. Le terme nanotechnologie recouvre un large éventail de matériaux allant des nanoparticules plasmoniques aux liposomes en passant par les nanotubes de carbone, de propriétés très différentes. Parmi ces nanotechnologies, les nanoparticules métalliques d'une taille comprise entre 2 et 200nm, dites plasmoniques, ont rapidement retenu l'attention. En effet, grâce au phénomène de résonance plasmon de surface, leur spectre présente un pic d'extinction intense et étroit dans le domaine du visible. Bien que les propriétés optiques de l'argent et de l'or lorsqu'ils sont en très faible quantité (quelque 10 à 100ppm) soit connues depuis longtemps dans le domaine artistique, il a fallu attendre l'arrivée de la théorie de Mie au début des années 1900 pour introduire les phénomènes de diffusion et d'absorption de la lumière par une sphère de dimension nanométrique[11, 12]. Par la suite, la possibilité de jouer avec leur forme et leur composition pour déplacer le pic plasmon ou changer la part relative d'absorption et de diffusion de la lumière en ont fait des candidats de choix pour divers champs d'application dont par exemple la médecine, mais aussi l'industrie alimentaire[13]. L'utilisation des nanotechnologies plasmoniques pour la médecine se décline à nouveau en plusieurs champs d'application. En imagerie par exemple, les nanoparticules plasmoniques, grâce à leurs pics d'extinction très étroits, peuvent être utilisés comme bio-marqueurs à des fins de diagnostic. En effet, chaque type de nanoparticule peut être fonctionnalisée au moyen d'anticorps spécifiques afin de s'at-

tacher à certains récepteurs cellulaires. Par ailleurs, de par leur interaction si particulière avec la lumière, la recherche s'est rapidement tournée vers des applications combinant l'utilisation combinée de ce type de nanoparticules et de lasers. De nombreuses propositions de traitements impliquant l'interaction de lasers de toute sorte, continus ou plusés, avec des nanoparticules ont ainsi vu le jour. Les nanoparticules peuvent être utilisées par exemple comme agents chauffants (nano-bâtons, nano-coquilles) pour diminuer la puissance laser requise pour des traitements par hyperthermie[14] ou comme vecteur de médicaments prêt à délivrer sa cargaison sous l'impulsion d'un laser (nanocage)[15, 16]. Une autre technique prometteuse est l'optoporation qui se propose comme technique de transfection cellulaire alternative à l'électroporation et à la transfection par virus inactivé[17]. La combinaison de ces nanoparticules avec des anticorps spécifiques permet de plus de diriger les nanoparticules vers les tumeurs en évitant les tissus sains. Cela permet donc une plus grande précision d'intervention, ce qui est particulièrement important lorsque l'on sait que l'un des risques majeurs de résurgence de la tumeur est dû aux cellules qui ont commencé à migrer hors de la tumeur principale. Malgré la profusion de recherches liant nanotechnologies et traitement du cancer, on pourra être surpris du peu de travaux réalisés sur le sujet pour les traitements intraoculaires, et particulièrement pour le rétinoblastome[18]. La plupart se sont par ailleurs concentrés à améliorer la spécificité ou l'efficacité des traitements existants pour la délivrance de médicaments par exemple ou la radiothérapie. De plus, très peu d'entre eux se sont vraiment intéressés à la structure tridimensionnelle des tumeurs ou à la viscosité du milieu dans lequel elles se trouvent. Mis à part un article publié très récemment on ne trouve pour ainsi dire aucune publication concernant l'utilisation conjointe de laser et de nanoparticules plasmoniques pour le traitement du rétinoblastome.

Comme souvent lorsqu'il s'agit de traitement contre le cancer, deux principaux enjeux se dégagent de la revue de littérature effectuée : s'assurer que suffisamment de cellules cancéreuses ont été tuées pour empêcher leur re-prolifération tout en évitant d'endommager les tissus alentours. Dans ce mémoire nous présenterons donc une approche pour le traitement du rétinoblastome en utilisant l'action combinée d'un laser (CW et nanoseconde) et de nanoparticules d'or *in vitro*, sur les cellules en suspension Y79. Après avoir établi certains résultats concernant les différents paramètres influençant le traitement proposé, et avoir examiné l'utilisation d'un laser pulsé versus un laser continu, nous nous intéresserons à la fabrication d'un simili vitré, caractérisé par sa viscosité. Les mêmes expériences seront à nouveau mis en place dans cet environnement visqueux pour estimer l'impact de la viscosité sur le traitement proposé. Les points sur lesquels nous nous sommes concentrés sont les suivants :

- Proposer des paramètres acceptables pour un traitement laser du rétinoblastome à l'aide de nanoparticules *in vitro*. L'étude se base sur 3 paramètres principaux, à savoir

la concentration en nanoparticules, la fluence utilisée et le type de laser utilisée.

- Réaliser un simili-corps vitré qui soit représentatif de la réalité
- Vérifier que les conditions proposées initialement peuvent être appliquées dans un environnement visqueux.

Après avoir présenté une brève revue de littérature nous nous attachons dans ce mémoire à décrire les résultats obtenus. La revue de littérature se découpe en trois sections principales. Dans la première, nous nous intéresserons à la description de l'anatomie de l'oeil, aux signes cliniques et occurrence du rétinoblastome ainsi qu'aux traitements usuels et en cours d'investigation. Dans un second temps, nous présentons quelques exemples de thérapies au laser dans l'oeil, ainsi que leur caractéristiques. Pour finir, la dernière partie de la revue de littérature est consacrée à l'étude de l'interaction nanoparticule plasmonique/laser, ainsi qu'à leur application pour diverses thérapies. En ce qui concerne les résultats, nous démontrons *in vitro* la preuve de concept d'un traitement des cellules de RB, à l'aide d'une thérapie laser assistée par nanoparticules d'or. Nous présenterons dans une première partie les résultats obtenus pour différents paramètres d'irradiation, dans un environnement de culture classique puis, dans un second chapitre, nous nous proposerons un modèle pour un simili-corps vitré ainsi que les résultats obtenus dans cet environnement visqueux. Un chapitre de discussion suivra la présentation des résultats.

On pourra également trouver, en Annexe A, des résultats préliminaires sur la mesure de température autour d'une nanoparticule sous irradiation laser par méthode spectroscopique. Ce travail, mené en parallèle des recherches sur le traitement du rétinoblastome avait pour but initial de mener à une meilleure compréhension de l'interaction nanoparticule - laser.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 L’œil et le rétinoblastome

Le rétinoblastome étant un cancer intraoculaire se développant chez l’enfant, nous avons jugé opportun de commencer par présenter quelques données très générales sur l’anatomie de l’œil et son développement durant les premières années suivant la naissance. Ces données permettront de mieux comprendre les différents enjeux liés au développement de la tumeur ainsi qu’à son traitement. Une attention plus particulièrement sera portée sur la composition et les propriétés du corps vitré, partie centrale de l’œil dans laquelle la tumeur peut essaimer après un certain temps. Dans un second temps, nous présentons dans cette section les différents stades de développement du cancer, ainsi que les traitements utilisés aujourd’hui pour en faire l’éradication. Un paragraphe sera également consacré aux traitements expérimentaux qui semblent faire l’objet d’intenses recherches ces dernières années.

2.1.1 L’œil chez l’enfant

Anatomie de l’œil chez l’enfant

Le schéma de la figure 2.1 représente les traits principaux de l’anatomie de l’œil. On estime qu’à la naissance la longueur axiale du globe est d’environ 16,5 à 18mm. Au cours des 18 premiers mois on observe une élongation d’environ 3,5mm puis, jusqu’à l’âge de 3-4 ans, une augmentation d’1mm par an est reportée dans la littérature[1]. Quelques grandeurs caractéristiques de l’évolution des dimensions de l’œil au fil du temps sont présentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Évolution avec l’âge des grandeurs caractéristiques de l’œil chez l’humain. Les distances indiquées sont prises dans le plan de coupe présenté à la figure 2.1, le long de l’axe optique et les valeurs sont issues de la littérature[1]. r_c est le rayon de courbure de la cornée.

Partie de l’œil	Naissance	1 an	2 ans	3 ans	adulte
Vitré	11mm	14mm	14,8mm	15,2mm	15,7mm
Chambre antérieure	2,55mm	2,88mm			3,1mm
Cornée (\varnothing_{eq})	9,5 à 9,8mm	>11mm	11,4mm	11,8mm	11,8mm
Cornée (r_c)	6 à 7,4mm	-	-	-	7,9mm
Cristallin (ép.)	3,4 à 4mm	3,1 à 3,7mm	-	-	2,9 à 3,5mm
Cristallin (\varnothing_{eq})	6 à 6,5mm	-	-	-	8,1 à 8,5mm

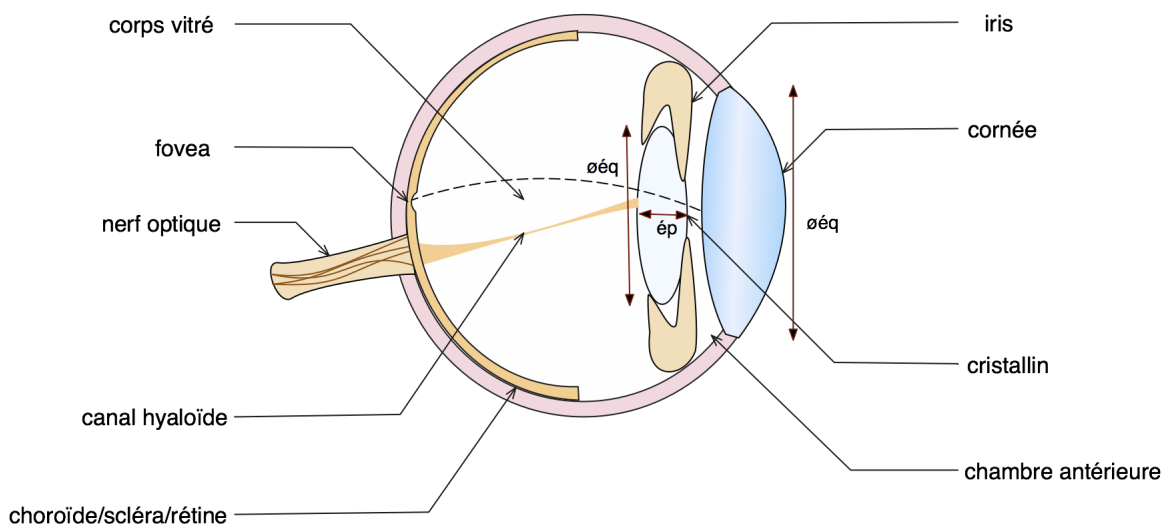


Figure 2.1 Schéma de l'œil. Le trait pointillé représente l'axe optique. Les distances indiquées font référence aux valeurs du tableau 2.1

Le corps vitré

Bien que celui-ci occupe une place relativement importante dans l'œil, les fonctions du corps vitré sont encore aujourd'hui assez méconnues. De nombreuses hypothèses, telles que la protection contre le stress mécanique, ou le blocage du flux de cellules provenant des tissus alentour ont notamment été avancées[19]. Pour un enfant de 5 à 10 ans, le volume du vitré est estimé à $3,4\text{cm}^3$ [1]. La composition du corps vitré est amenée à évoluer énormément au fil du temps et sa viscosité diminue[2]. À la naissance, il est constitué quasiment intégralement de gel, et possède donc une viscosité très élevée (100 à 400cP). Au fil du temps, le corps produit moins de collagène et le gel laisse place progressivement à une phase aqueuse beaucoup moins visqueuse. Une représentation schématique du vitré, tirée de l'article de Sebag et al. est disponible en figure 2.2[2]. À l'âge adulte il est composé à 98% d'eau, 1% de collagène et d'acide hyaluronique, le pourcentage restant étant composé principalement de protéines et de quelques cellules du système immunitaire. Sa composition et sa viscosité dépendent également de la région de l'œil à laquelle on s'intéresse et ne seront pas nécessairement identiques selon que l'on observe la chambre antérieure, postérieure ou centrale. Si l'on connaît encore mal toutes les fonctions remplies par le vitré, il est en revanche remarquable de constater que des changements dans sa structure physico-chimiques sont fréquemment liés aux différentes pathologies de l'œil que l'on connaît. Il est notamment reconnu que, le plus souvent, la viscosité diminue fortement en cas de maladie.

Propriétés rhéologiques et optiques

Dans la littérature, les sources donnant la viscosité du corps vitré sont extrêmement disparates. Certains font mention d'une viscosité dynamique variant de 300 à 2000 cP, tandis que d'autres sources mentionnent une viscosité 2 à 4 fois plus élevée que celle de l'eau, qui s'élève à 0,8cP à 37°C[19, 20, 21]. Une des raisons pour laquelle on trouve des valeurs aussi variables dans la littérature est la non-homogénéité du corps vitré, qui se présente sous deux phases : l'une aqueuse et l'autre sous forme de gel. Selon la phase considérée, ou la proportion relative des deux phases dans les échantillons on peut ainsi trouver des viscosités très différentes. Un autre paramètre concerne les conditions dans lesquelles ces expériences ont été menées, notamment en termes de température. Par ailleurs de nombreux articles utilisent des modèles différents, ce qui peut conduire à des définitions différentes de la viscosité (résiduelle, rémanente, etc.) qui est parfois reportée par erreur comme étant la viscosité dynamique[5]. S'il existe un faible flux au sein du vitré, il est couramment admis que les cellules du rétinoblastome ne se déplacent que très peu au sein de la cavité vitréenne. La viscosité du corps vitré est un des freins majeurs à la délivrance de médicaments dans l'oeil et oblige le plus souvent à faire des injections intravitréales. En effet, les médicaments ont une durée de vie limitée dans le vitré et une grosse partie va être éliminée via les larmes et le flux présent dans l'humeur aqueuse, située dans la chambre antérieure[22]. Par ailleurs, la plupart des médicaments utilisés ont une fenêtre d'utilisation très étroite en terme de concentrations : une concentration trop faible n'aura aucun effet mais une concentration trop élevée fait encourir le risque d'une toxicité systémique[23, 24]. Ainsi, augmenter simplement la concentration en médicaments n'est pas une option envisageable. Le flux intravitréen est estimé entre 0.1 et 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ [22, 25]. D'après les études rhéologiques et simulations réalisées précédemment, il semblerait que le flux intravitréen joue plus particulièrement un rôle pour la distribution de médicaments à faible coefficient de diffusion moléculaire dans le corps vitré.

En ce qui concerne les propriétés optiques, le spectre d'absorption du corps vitré correspond globalement à celui de l'eau, son principal constituant. Son indice de réfraction, également proche de celui de l'eau se situe entre 1,3345 et 1,337[26, 27].

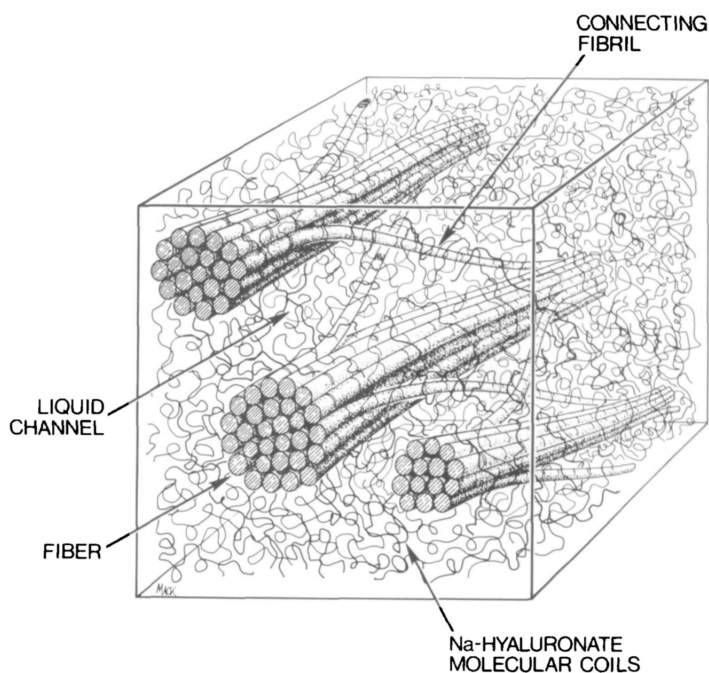


Figure 2.2 Représentation schématique du corps vitré[2]. Les fibres de collagène ont un diamètre estimé à 15nm environ,

Reconstitutions du corps vitré

La reconstitution du corps vitré est étudiée principalement pour trouver un substitut afin de l'injecter chez le patient suite à certaines opérations requérant d'ôter partiellement ou totalement le contenu de la cavité vitréenne. Cela peut-être le cas par exemple lors d'opérations liées à la dégénérescence maculaire ou à des mélanomes. En clinique, les produits utilisés varient de l'huile de silicone aux alcanes semi-fluorés[28]. Il arrive aussi parfois que l'on utilise des substitut gazeux lorsqu'il s'agit d'un état transitoire. Cependant, de nombreux rapports de non biocompatibilité de ce type de produits peuvent être relevés dans la littérature et ne les rend pas compatible avec une substitution du vitré sur le long terme[29, 30]. Les hydrogels, dont la composition se rapprocherait plus de celle originelle du corps vitré en sont encore au stade expérimental. Pour ce type d'application, un soin particulier est généralement accordé à la reproduction fidèle de la substance, tant au niveau de ses propriétés optiques que rhéologiques. Les substituts proposés sont généralement des hydrogels contenant à la fois du collagène et de l'acide hyaluronique, composés principaux du corps vitré, mais l'on peut également retrouver des substituts à base d'agar[31]. Le groupe de Kummer et al. a, quant à lui, utilisé une composition de simili-corps vitré destiné à faire des études *in vitro*, à base d'acide hyaluronique et de gel d'agar[31]. La validation du modèle proposé est faite via des

mesures rhéologiques, comparées aux valeurs trouvées dans la littérature.

2.1.2 Signes cliniques et occurrence du rétinoblastome

Le rétinoblastome est un cancer infantile de l'oeil qui touche environ 1 enfant sur 15 000 à 18 000. Il se manifeste généralement avant l'âge de 5 ans. Plusieurs symptômes tels que le strabisme ou une leucocorie, un reflet blanchâtre de la pupille, permettent de détecter la maladie mais sont souvent annonciateurs d'un stade relativement

avancé de la maladie. La leucocorie peut notamment se manifester lors de la prise d'une photographie, en lieu et place de l'effet d'"yeux rouges" usuellement observé. L'image de la figure 2.3 montre un exemple de patient atteint de rétinoblastome et chez qui l'on peut observer ce reflet blanchâtre.

Cette maladie est vraisemblablement due à une mutation du gène RB1, situé sur le chromosome 13 et présentant deux allèles. Seules des mutations affectant les deux allèles simultanément peuvent conduire au développement d'une tumeur[6, 32]. Ce gène est responsable de l'encodage de la protéine pRB, elle-même responsable de la régulation du cycle cellulaire au niveau de la rétine. Les noms de la protéine et du gène qui lui est affilié viennent par ailleurs directement de leur grande incidence sur le déclenchement du rétinoblastome. La mutation du gène peut intervenir de manière héréditaire ou sporadique. Une théorie proposée par Knudson et al. en 1971 considère que deux mutations génétiques sont nécessaires au développement du rétinoblastome. Bien que certains auteurs avancent que cette théorie présente quelques faiblesses, elle permet d'expliquer la plus grande occurrence de rétinoblastomes bilatéraux dans les cas héréditaires que dans les cas de cancer sporadique. En effet, dans le premier cas, cela signifie que toutes les cellules de la rétine ne possèdent qu'un seul allèle sain, et par conséquent, qu'une seule mutation sera nécessaire au développement de la maladie[33, 34]. Les situations héréditaires sont toutefois moins fréquentes que les situations sporadiques, qui conduisent quasiment invariablement à des tumeurs unilatérales isolées. Aucun autre gène n'a jusqu'à ce jour été identifié comme participant au processus et aucune corrélation avec le sexe ou l'origine ethnique n'a été clairement établie.

Deux principaux stades de développement de la tumeur sont reportés dans la littérature. Tout d'abord, la tumeur se développe sur ou à l'intérieur de la rétine. Ce stade est lui-même divisé en deux groupes par la Classification internationale du rétinoblastome intraoculaire[9] : si la tumeur est d'un diamètre inférieur à 3mm, et située suffisamment loin de la fovea, ou du nerf optique il s'agit du groupe A, dans le cas contraire, du groupe B. Dans un second temps, si le cancer n'est pas pris en charge assez tôt, un phénomène d'essaimage apparaît et des cellules cancéreuses viennent former des amas flottant dans le corps vitré, région visqueuse située



Figure 2.3 Photographie d'un patient, atteint de rétinoblastome unilatéral. Un reflet blanchâtre est visible au niveau de la pupille de l'oeil droit. Source : National Cancer Institute, 1989.

au centre de l'oeil. Lorsque cet envahissement concerne moins des 2/3 du globe oculaire, la tumeur est classifiée comme appartenant au groupe C. Le groupe D concerne des tumeurs avec envahissement massif vitréen ou sub-rétinien, parfois associées à un décollement de la rétine et l'apparition d'un glaucome. Pour finir, le groupe E est déclaré lorsque la masse tumorale concerne plus des 2/3 du globe oculaire et fait obstruction au champ de vision ou qu'il y a un diagnostic d'hémorragie intravitréenne.

2.1.3 Traitements actuels du rétinoblastome

Comme pour la plupart des cancers, le type de traitement appliqué dépend principalement du stade de développement de la tumeur et de sa localisation dans la cavité oculaire[35]. Ainsi, lorsque la tumeur est petite ($<3\text{mm}$) et localisée sur la rétine (groupes A et B), des traitements de cryothérapie, de thermo-thérapie et de photocoagulation laser sont effectués, parfois complétés avec une chimiothérapie localisée[36]. En revanche, lorsque la tumeur commence à infiltrer le corps vitré, la liste des thérapies disponibles se restreint considérablement. Une description un peu plus précise des traitements usuels est disponible ci-après.

Cryothérapie

La cryothérapie consiste à introduire à proximité de la tumeur une sonde métallique refroidie à des températures très basses (-90°C), ce qui entraîne la formation de cristaux à l'intérieur

des cellules et cause la rupture de la membrane. D'après Shields et al. la cryothérapie peut être pratiquée de manière efficace pour des tumeurs de diamètre inférieur à 2.5mm et d'épaisseur inférieure à 1mm[37]. Pour les tumeurs légèrement plus grandes (3.5mm de diamètre jusqu'à 2mm d'épaisseur), la répétition du traitement peut donner de bons résultats. En revanche, le traitement doit être complété avec d'autres méthodes pour les cas présentant une migration de la tumeur vers le vitré. Sur l'ensemble des cas traités (94) 21% ont dû faire l'objet d'un traitement d'appoint. Un des inconvénients de cette technique est que la cicatrice laissée sur le tissu est généralement d'une taille bien supérieure à la celle de la tumeur originelle et entraîne souvent des troubles de la vision[36, 35].

Thermothérapie

Le but de la thermothérapie est d'atteindre une température locale de 40 à 60°C afin de provoquer la nécrose du tissu. De nos jours, la source de chaleur utilisée est généralement un laser. Principalement deux longueurs d'ondes sont utilisées pour cela, dans l'infrarouge ou à 532nm. La durée du traitement varie de 20 à 40 min pour une puissance surfacique comprise entre 20 et 30 W/cm²[38]. Le traitement est parfois conjugué à de la chimiothérapie localisée. À nouveau, ce type de traitement ne convient que pour des tumeurs rétinienne de dimensions limitées.

Chimiothérapie intraoculaire

La chimiothérapie est utilisée à différents stades de développement du RB, seule ou comme traitement d'appoint à d'autres thérapies mentionnées plus haut. Une stratégie courante consiste par exemple à faire ce que l'on appelle une chimioréduction de la tumeur : on applique un traitement chimiothérapeutique pour ramener la tumeur à des dimensions acceptables pour un traitement laser ou par cryothérapie. On utilise alors de plus faibles doses, ce qui limite les effets indésirables habituellement associés à ce type de traitement. Les composés utilisés sont généralement le carboplatine, la vincristine et l'épotoside, isolés ou combinés. On procède le plus souvent à un minimum de 6 cycles de traitement avant d'observer, dans certains cas, une rémission de la tumeur. Il existe deux modes principaux d'injection : intra-veineux et intra-vitréen. Le principal inconvénient du premier mode d'injection est qu'il ne convient ni pour des tumeurs subrétinales ni pour les agrégats cellulaires dans le vitré car ceux-ci ne sont pas vascularisés. L'injection intravitréenne permet d'atteindre les tumeurs ayant essaimé dans le vitré mais il reste très difficile d'atteindre le centre de la tumeur. Par ailleurs, cela augmente considérablement les risques de disperser la tumeur, à cause du flux généré par l'injection[35]. De plus fortes doses sont appliquées lorsque les autres techniques

ont échoué. Avec la radiothérapie, il s'agit du seul traitement encore applicable lorsque la tumeur a essaimé dans le vitré.

Radiothérapie

La radiothérapie, autrefois très utilisée, est parfois appliquée en traitement d'appoint pour les tumeurs les plus résistantes[39]. En effet, la tumeur de rétinoblastome est radiosensible et peut être traitée à l'aide de disque d'Iode-125. Cette technique est toutefois peu usitée en raison de forts effets indésirables et d'un risque accru de développer une seconde tumeur post-traitement. Il semblerait qu'elle ait cependant fait montre d'une grande efficacité pour des traitements post-énucléation relatifs à des risques de résurgence sur la cavité oculaire[40].

Énucléation

Pour finir, lorsque le traitement en chimiothérapie ne permet pas d'éradiquer la tumeur, ou lorsque la tumeur appartient aux groupes E ou D et que l'on a affaire à un cas de rétinoblastome unilatéral, on procède généralement à une énucléation de l'oeil atteint, afin d'éviter une migration des cellules vers le cerveau. Cette énucléation est souvent accompagnée d'un traitement chimio-thérapeutique pour éviter les risques de résurgence à la surface de la cavité oculaire[35, 36, 41].

2.1.4 Traitements en cours d'investigation

Parmi les traitements en cours d'investigation ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'amélioration de traitements existants, que ce soit en terme de spécificité envers les cellules cancéreuses ou d'amélioration de la pénétration dans les tumeurs[18]. Quelques traitements ayant retenu notre attention sont décrits ci-dessous, à l'exception de traitements mettant en jeu des nanoparticules plasmoniques qui seront décrits dans une prochaine section.

De nombreuses publications concernent de nouveaux composés chimiques pouvant servir pour la chimiothérapie, ou permettant d'améliorer son efficacité. Le but est à la fois de prolonger la durée de vie des médicaments dans le vitré et d'améliorer le ciblage des tumeurs. Tout d'abord, de nouveaux agents chimiques ont été identifiés comme ayant une certaine efficacité tels que le topotécan ou le melphalan [42]. Ces dérivés ne sont cependant pas encore utilisés. Certains groupes proposent également d'utiliser des particules de protéines pour transporter l'agent thérapeutique (carboplatine par exemple) jusqu'aux tumeurs[43, 44, 45]. Quelques groupes se sont aussi intéressés à l'utilisation de liposomes *in vitro* et *in vivo*[46, 47], mais il est étonnant de constater que relativement peu d'études ont été menées en ce sens pour

les tumeurs intraoculaires. Ces deux études semblent s'entendre sur une internalisation des liposomes par cellules en l'espace de 30 à 60min pour des liposomes d'une taille inférieure au micromètre.

Qian Qiu et al. ont montré que l'utilisation de microparticules de dérivés de lymphocytes pouvaient avoir une incidence sur la prolifération des cellules Y79 ainsi que sur des cellules extraites de tumeurs de donneurs humains atteints de rétinoblastome, en augmentant le taux d'apoptose au sein des échantillons[48].

Certains groupes se sont également attachés à prouver l'efficacité de la thérapie photodynamique à la fois *in vitro* et *in vivo* pour le traitement du rétinoblastome[49, 50, 51]. Malgré des résultats prometteurs, ce traitement n'est généralement pas utilisé aujourd'hui, sans doute à cause de certains effets secondaires observés (douleur, inflammation, augmentation de la pression intraoculaire...)[52]. Gallud, Gary-Bobo et al. se sont intéressés à l'amélioration du ciblage des tumeurs en fonctionnalisant des nanoparticules de silice poreuses chargées de l'élément photosensible. Des études menées *in vitro* ont mené à la conclusion que la fonctionnalisation permettait d'augmenter l'endocytose des particules par les cellules et donc d'améliorer l'efficacité du traitement[53, 54].

2.2 Traitements au laser dans l'oeil

Les traitements laser en ophtalmologie existent depuis maintenant près de 60 ans et sont aujourd'hui chose courante[55]. Le but de cette section de la revue de littérature est d'établir une liste des traitements les plus répandus ainsi que des équipements existants afin de s'y référer pour proposer une solution acceptable. Une autre idée sous-jacente est la possibilité de réutiliser des équipements existants, réduisant ainsi les coûts liés au développement et à l'acquisition de nouveaux équipements médicaux dans les hôpitaux. En effet, comme pour la plupart des maladies, les chances d'éradication du cancer sont encore très liées à la région du globe dans laquelle on a la chance de naître. On trouvera donc dans la section qui suit, une liste des traitements laser employés aujourd'hui, par ordre croissant de fluence impliquée.

2.2.1 Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) est une thérapie largement répandue en ophtalmologie. Elle consiste généralement en l'utilisation de composés chimiques photosensibles qui, une fois excités, se mettent à produire des oxygènes singulets (ROS) toxiques pour les cellules. Suite à l'émission de ROS, les cellules finissent par mourir, soit par apoptose soit par paraptose[56]. Pour le traitement des maladies liées à la rétine, on utilise généralement la

vertéporfine associée à un traitement laser autour de 689nm, d'une puissance variant de 300 à 600 mW/cm², pendant 1 min à 1min30[57]. P. Rundle propose également une revue de littérature de l'utilisation actuelle de la thérapie photodynamique pour les cancers de l'oeil[58]. Il cite notamment des études portant sur le mélanome choroidal, montrant une efficacité de 80 à 89%. L'utilisation de la PDT est aussi reportée pour le traitement de métastases choroidales. La vertéporfine est diffusée pendant 10 min puis on procède à une irradiation à 600mW/cm² pendant 83s pour des tumeurs de diamètre inférieur à 2mm[59].

2.2.2 Photocoagulation

Pour la photocoagulation, le laser utilisé est le plus souvent un laser de type Nd :YAG CW, opérant à 532nm. Cette thérapie se base sur la forte absorption de l'hémoglobine dans le vert pour lutter contre l'angiogénèse induite par certaines maladies (glaucome, mélanome etc.). Les puissances utilisées sont généralement autour de 70 à 200mW pour un faisceau d'environ 75μm. Le faisceau est dirigé directement sur la rétine et les zones contenant de l'hémoglobine absorbent fortement jusqu'à brûler les vaisseaux sanguins alimentant la tumeur.

2.2.3 Photoablation

La photoablation est une technique couramment utilisée pour la correction de diverses aberrations optiques telles que la myopie, l'hypermétropie, la presbytie et l'astigmatisme. Il existe deux techniques principales, la kératectomie photoréfractive avec laser excimère (PKR) et le Lasik (Laser-Assisted In-Situ Keratomileusis). La première opération utilise un laser excimère ($\lambda = 230nm$) pour vaporiser des couches de cornée après en avoir retiré l'épithélium grâce à un solvant. Une fluence de 180mJ/cm² par impulsion pour un taux de répétition de 10Hz est reportée dans la littérature. Le nombre d'impulsions envoyé est calculé en fonction de l'épaisseur de la couche à vaporiser, à raison de 0,22μm par impulsion. Le Lasik se déroule en deux étapes. La première étape consiste à découper une fine lamelle de la cornée afin d'accéder aux couches antérieures et de procéder à un remodelage en profondeur. Cela a notamment permis à plus de patients, dont la cornée était d'épaisseur trop importante pour la chirurgie classique, d'accéder à l'opération. Cette première étape, initialement réalisée à l'aide d'un microkératome, se fait aujourd'hui à l'aide d'un laser femtoseconde ($\lambda = 800nm$, 400 à 800fs). L'énergie délivrée par impulsion dépend des systèmes et est liée au taux de répétition du laser. Elle est généralement comprise entre 40nJ et 4μJ. La seconde étape consiste à nouveau à faire le remodelage de la cornée avec un laser excimère ($\lambda = 230nm$) opérant à 160mJ/cm².

2.2.4 Vitréolyse

La vitréolyse est une technique développée à la fin des années 80 pour éliminer les corps flottants à l'intérieur du corps vitré[60]. Ce problème survenant avec le vieillissement, le traitement est principalement appliqué à des adultes. Les corps flottants peuvent être de différentes natures et de différentes tailles, allant de quelques microns à quelques centaines de micromètres. Si les plus petits sont souvent éliminés naturellement par le système immunitaire, les plus gros peuvent persister et provoquer chez le patient une gêne oculaire, ce qui peut mener à des pertes d'équilibre et un mal-être général. Le traitement préconisé est alors la vaporisation des corps flottants grâce à un laser Nd :YAG pulsé focalisé, opérant généralement à 532nm ou 1064nm. Des énergies variant de 1,2 à 12mJ par impulsion, pour un faisceau de $8\mu\text{m}$ de diamètre sont reportées dans la littérature[61, 62, 63, 64]. La puissance utilisée est suffisamment forte pour provoquer un claquage optique dans l'eau et vaporiser les corps flottants. Les débris, de plus petite taille, seront ensuite éliminés par le système immunitaire. Le traitement est aujourd'hui largement répandu malgré le report de complications post-traitement chez certains patients, et certaines restrictions liées à la proximité des corps flottants avec la rétine ou le nerf optique. L'existence de ce traitement est particulièrement intéressante car le mode opératoire se rapproche fortement de la solution envisagée ici pour le traitement du rétinoblastome, et utilise des puissances très supérieures à celles proposées. Il s'agit donc d'un bon indicateur de faisabilité du traitement proposé, qui laisse entrevoir potentiellement la possibilité d'adapter l'appareil pour en faire une double application. Cette technique, quoique proposée dans certains centres ophtalmologiques fait encore l'objet de suspicions chez certains praticiens, qui lui reproche d'avoir des effets secondaires tels que l'augmentation de la pression intraoculaire ou l'observation de dommages au niveau de la rétine[65, 66].

2.3 Nanoparticules plasmoniques et interaction avec la lumière

Puisque la solution proposée fait intervenir à la fois des nanoparticules d'or et l'utilisation de lasers, on s'intéresse dans cette section aux mécanismes physiques impliqués dans l'interaction nanoparticules plasmoniques-laser ainsi qu'aux utilisations que l'on peut trouver dans la littérature dans le domaine médical.

2.3.1 Propriétés optiques des nanoparticules plasmoniques

Les nanoparticules métalliques dites plasmoniques sont généralement d'une taille comprise entre 2nm et 200nm, qui leur confère des propriétés optiques particulières dans le domaine du

visible. Leur spectre présente en effet un fort pic d'extinction à une certaine longueur d'onde, dépendant des caractéristiques de la nanoparticule. Ce pic d'extinction, aussi appelé pic plasmon, provient du fort couplage entre l'onde électromagnétique incidente et les électrons de conduction du métal composant la nanoparticule. En effet, l'onde incidente aura pour effet de déplacer les électrons qui, s'éloignant de leurs noyaux, vont contribuer à créer une force d'attraction exercée par ces derniers pour compenser la perte de charge. On se retrouve ainsi avec un oscillateur harmonique. Lorsque la fréquence de vibration des électrons coïncide avec la fréquence de l'onde électromagnétique incidente, elles entrent alors en résonance. C'est ainsi qu'en jouant avec leur composition, leur taille et leur forme, il est possible notamment de fabriquer des nanoparticules sur mesure pour une application donnée, de sorte à ce que leur maximum d'extinction, dans l'environnement souhaité, soit situé à la longueur d'onde voulue. La figure 2.4 montre des nanoparticules d'alliage Or-Argent de différentes compositions dont les pic d'extinction correspondent à des longueurs d'onde particulières. Ces propriétés optiques particulières, associées à une relative stabilité en fait des candidats de choix pour les applications utilisant des biocapteurs (pathologie, alimentation etc.)[67]. L'interaction des nanoparticules avec la lumière implique deux mécanismes principaux : l'absorption et la diffusion. La théorie de Mie permet de calculer pour des nanoparticules sphériques les contributions respectives de chacun des deux mécanismes. On constate que, globalement, pour des nanoparticules d'or, la section efficace d'absorption des nanoparticules est proportionnelle à r_{np}^3 . Par ailleurs, pour des nanoparticules de rayon supérieur à 60nm, la diffusion devient de plus en plus importante.

2.3.2 Interaction avec un faisceau laser émettant des impulsions brèves

Étude d'une seule nanoparticule

Pour des pulsations relativement longues on observe une compétition entre la diffusion et l'absorption, représentées par les sections efficaces respectives des deux phénomènes. Le phénomène de diffusion de la lumière prend de plus en plus importance avec l'augmentation du rayon de la nanoparticule. Il existe de nombreux modèles théoriques expliquant l'interaction singulière d'une nanoparticule avec un faisceau laser, pour plusieurs échelles temporelles d'irradiation[68, 69]. Plusieurs régimes d'interaction, allant du chauffage à la vaporisation de la nanoparticule ont été identifiés, dépendamment de la durée d'impulsion et de la fluence utilisée[70]. Le schéma de la figure 2.5, tiré de la littérature, illustre ces différents régimes. Sous certaines approximations, la température à la surface d'une nanoparticule de rayon r_{np} et de section efficace d'absorption σ_{abs} , pour des impulsions de l'ordre de la nanoseconde et

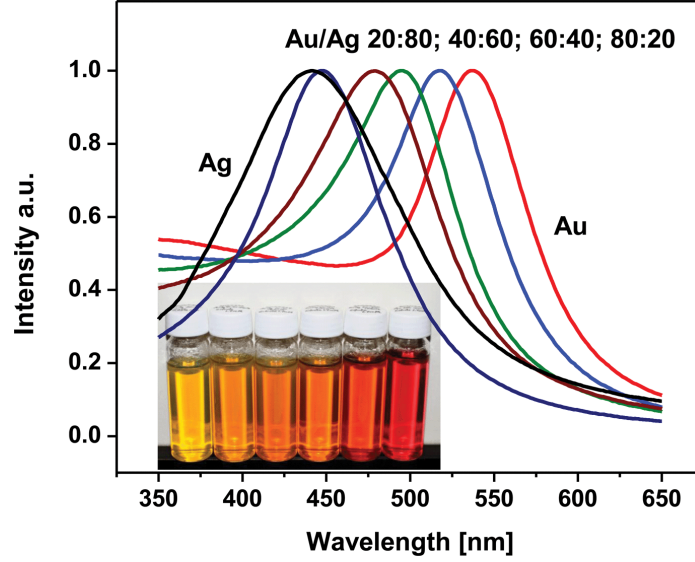


Figure 2.4 Spectres bien distincts de nanoparticules d'alliage Or-Argent de différentes compositions. La photographie montre les solutions colloïdales correspondantes et fait apparaître les différences de lumière transmise[3].

plus longues peut s'exprimer de la façon suivante[71] :

$$\Delta T_{nano} = T - T_{\infty} = \frac{dQ_{nano}/dt}{4\pi\kappa r_{np}} \quad (2.1)$$

Avec κ la conductivité thermique de l'eau, estimée à $0,3W.m^{-1}.K^{-1}$ et

$$\frac{dQ_{nano}}{dt} = P_{laser} * \sigma_{abs} \quad (2.2)$$

où P_{laser} est la densité de puissance laser utilisée (en $W.m^{-2}$). De l'équation de la chaleur, on peut également tirer un temps caractéristique nécessaire à atteindre le régime permanent, dépendant de la diffusivité thermique D du milieu environnant :

$$\tau_{nano} = \frac{r_{np}^2}{D} \quad (2.3)$$

On constate ainsi que le régime permanent autour d'une nanoparticule d'or de 100nm dans l'eau ($D = 10^{-7}m^2/s$) s'établit aux environs de la centaine de nanosecondes. Quelques groupes se sont intéressés à mesurer l'élévation de température autour d'une nanoparticule. Certains ont utilisé des méthodes indirectes (technique de corrélation en fluorescence[72], dépôt des nanoparticules sur un film thermo-sensible[73]) et d'autres des méthodes spec-

troscopiques directes (spectroscopie en champ sombre, spectroscopie Raman[74]). En effet, lorsqu’une nanoparticule chauffe, la fonction diélectrique du métal qui la compose évolue, de même que celle du milieu environnant. La modification des modèles de Drude et interbande pour tenir compte de cette dépendance en température des fonctions diélectriques permet ainsi, grâce à la théorie de Mie, de constater un déplacement du pic plasmon de la nanoparticule vers le rouge ou vers le bleu, selon le milieu environnant [75, 76]. Plus de détails concernant ce phénomène sont disponible en Annexe A, ainsi que quelques résultats produits au sein de notre laboratoire, d’après les travaux originaux menés par Setoura et al[76].

Chauffage de plusieurs nanoparticules

L’étude des nanoparticules en solution colloïdale peut, elle aussi, mener à des résultats intéressants. En effet, l’irradiation de plusieurs nanoparticules à la fois, si l’on se situe dans des temps d’irradiation suffisamment longs, va permettre de considérer chaque nanoparticule individuelle comme une source de chaleur. Ainsi même si l’élévation de température locale reste faible, l’augmentation de température globale peut être très élevée. En reprenant les équations simplifiées décrites précédemment, on peut établir la relation suivante, valide en régime permanent[71], où ρ_{np} est la concentration en NPs et R une distance caractéristique de la zone irradiée :

$$\Delta T_{global} = \frac{\rho_{np} R^2 dQ_{nano}/dt}{2\kappa} \quad (2.4)$$

Ainsi, l’action conjuguée de quelques millions de nanoparticules d’or dont l’élévation de température à la surface ne dépasse pas le millième de degré Celsius permet d’augmenter la température globale de quelques dizaines de degrés. C’est notamment ce phénomène qui est généralement utilisé pour faire des traitements de cancer par hyperthermie. En raison de leur faible efficacité à absorber la lumière, les nanoparticules d’or sphériques classiques sont souvent délaissées pour des structures plus complexes telles que des nanoparticules de type coeur-couronne ou des nanobâtons. Des travaux menés par le groupe de Naomi Halas suggèrent d’utiliser des nano-matryoshkas (coeur-couronne-couronne) pour faire bouillir de l’eau afin de la purifier. D’un point de vue théorique, cette étude démontre que, si la concentration en nanoparticules est supérieure à 10^9 NPs/mL, un photon initialement diffusé par une nanoparticule peut être absorbé par une nanoparticule voisine et participer au phénomène de chauffage. Une bonne adéquation entre les simulations Monte-Carlo réalisées et les mesures *in situ* est observée[77].

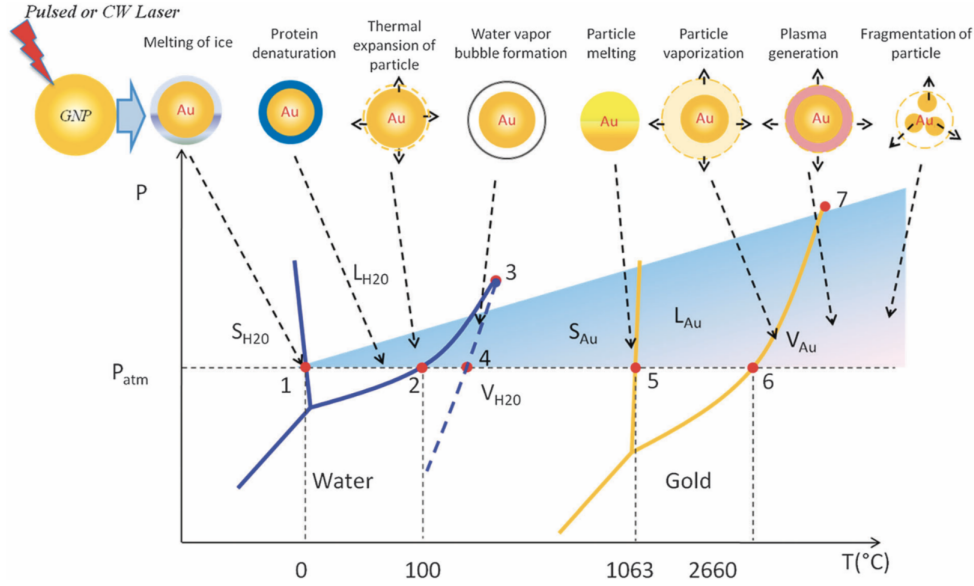


Figure 2.5 Schéma représentant les différents états d'une nanoparticule d'or de 100nm en fonction de la température[4]. Changement d'états de l'eau (1 : Fusion, 2 : Vaporisation, 3 : Point critique, 4 : Point spinodal) et de l'or (5 : Fusion, 6 : Vaporisation, 7 : Point critique).

2.4 Nanoparticules plasmoniques et traitement du cancer

Les propriétés optiques des nanoparticules métalliques, caractérisées par leur forte capacité d'absorption et de diffusion de la lumière à une longueur d'onde donnée en ont fait des candidats naturels pour l'investigation de nouveaux traitements contre le cancer. On les retrouve dans différents types d'applications dont une liste non exhaustive est décrite un peu plus précisément ci dessous. La plupart des nanoparticules métalliques utilisées dans le domaine médical sont des nanoparticules d'or à cause de leur meilleure biocompatibilité. On retrouve également des nanoparticules d'argent ou d'alliage. Ces nanoparticules sont déclinées sous différentes formes et différentes compositions en vue d'ajuster leur propriétés plasmoniques à l'application visée. Pour les applications combinées avec l'utilisation de laser, elles sont le plus souvent utilisées afin de diminuer la fluence nécessaire pour obtenir des effets similaires, comme l'illustre la figure 2.6

2.4.1 Transport de médicaments

Une application notable des nanoparticules d'or est le transport et la délivrance ciblée de médicaments. Les nanoparticules d'or peuvent être utilisées soit comme vecteur, soit comme agent chauffant pour ouvrir des liposomes contenant des médicaments[78]. Le ciblage des

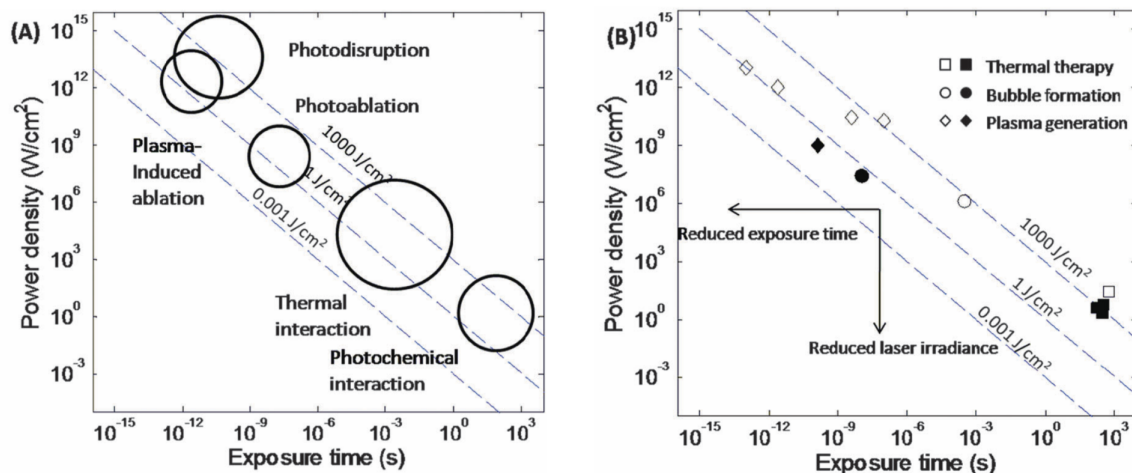


Figure 2.6 (A) Carte de l'interaction laser-tissu sans présence de nanoparticules. (B) Différents niveaux d'énergie nécessaires pour observer les mêmes effets avec (symboles pleins) ou sans nanoparticules (contours seuls). On constate que l'introduction de nanoparticules d'or permet d'abaisser les fluences nécessaires pour atteindre les mêmes régimes d'interaction[4].

cellules se fait via la fonctionnalisation des nanoparticules ou des liposomes utilisés, grâce à des anticorps. Diverses études ont été menées *in vitro* pour différents type de maladies[79], et on dénombre également quelques études *in vivo* chez le rat[80].

2.4.2 Transfection

L'optoporation, mot-valise calqué sur l'électroporation, est une technique prometteuse de transfection cellulaire. Elle est en effet considérée comme beaucoup moins traumatique que les techniques d'électroporation, et moins risquée que les méthodes impliquant des vecteurs viraux désactivés. Basée sur l'interaction des nanoparticules avec un laser, deux méthodes principales ont été soumises à investigation. La première consiste à faire une irradiation longue et à basse puissance à l'aide d'un laser continu afin de faire chauffer les nanoparticules plasmoniques situées à proximité des cellules. Sous l'effet du chauffage, les membranes cellulaires se dilatent et permettent à l'ADN de pénétrer dans les cellules. La seconde méthode consiste à utiliser des impulsions ultra-brèves hors résonance plasmonique afin de générer des bulles micrométriques, qui viennent déstabiliser la membrane cellulaire et créer des pores, permettant ainsi à l'ADN de s'infiltrer à l'intérieur de la cellule. Le groupe de Naomi Halas propose également une méthode composite permettant notamment de délivrer de façon contrôlée de l'ADN double brin ou simple brin, selon le type d'irradiation utilisé[81]. Le groupe de Michel Meunier a également travaillé sur le sujet et un article a récemment été publié pour une étude

in vivo chez le rat[17]. Des nanoparticules d'or de 100nm fonctionnalisées sont irradiées hors-résonance à l'aide d'un laser femtoseconde émettant à 800nm, à une fluence moyenne allant de 120 à 700mW (80MHz, 15-30sec). Il a ainsi été prouvé que, sous ces conditions, il était possible de transférer du matériel génétique à l'intérieur de cellules rétinienne sans induire de mort cellulaire significative.

2.4.3 Hyperthermie

L'hyperthermie assistée de nanoparticules plasmoniques fait sans doute partie des traitements impliquant des nanomatériaux les plus avancés, avec notamment le début de quelques essais cliniques. L'utilisation de la chaleur comme traitement de tumeurs cancéreuses est répandue depuis plusieurs décennies. Avec l'avènement des nanotechnologies, l'idée d'utiliser des nanoparticules plasmoniques pour améliorer l'absorption de l'irradiation laser s'est rapidement imposée. Pour réaliser des traitements par hyperthermie, il est important d'avoir en tête quelques échelles de temps nécessaire au chauffage des différents éléments du système. Ainsi, si la température autour d'une nanoparticule d'or sous irradiation atteint son régime permanent au bout de quelques centaines de nanosecondes, il faut en revanche environ 1ms pour observer une stabilisation de la température à l'échelle d'une cellule d'une dizaine de micromètres de diamètre. Le schéma de la figure 2.7, issu de la revue de littérature de Zhenpeng Qin et John C. Bischof[4], illustre particulièrement bien ce phénomène. Au fil de l'apparition de structures de plus en plus complexes, la méthode s'est raffinée et des essais cliniques ont pu commencer pour le traitement de cancer de la nuque[82]. L'utilisation de nanobâtons ou de nano-coquilles est généralement privilégiée pour deux raisons principales [83, 84, 85]. La première est que cela permet de déplacer le pic d'absorption dans le proche infra-rouge, améliorant ainsi la pénétration du laser dans la plupart des tissus. La deuxième raison concerne la forte efficacité d'absorption de ce type de nanoparticules qui permet ainsi de diminuer considérablement la puissance laser nécessaire. Une puissance de 3,5 à 5 W/cm² provenant d'un laser CW émettant à 808nm pour une concentration de 5 à 7mL/kg de nanoparticules concentrées à 100OD ont été utilisés pour l'essai clinique mené avec la technologie AuroLase. Ce type de traitement permet de prendre le relai de la photocoagulation pour des tumeurs trop profondes (la pénétration dans les tissus est très faible à 532nm) ou trop peu vascularisées.

2.4.4 Cas du rétinoblastome

En ce qui concerne le rétinoblastome, très peu de thérapies impliquant des nanoparticules d'or ont fait l'objet de recherches. Une étude réalisée par Kim et al.[86] examine l'injection

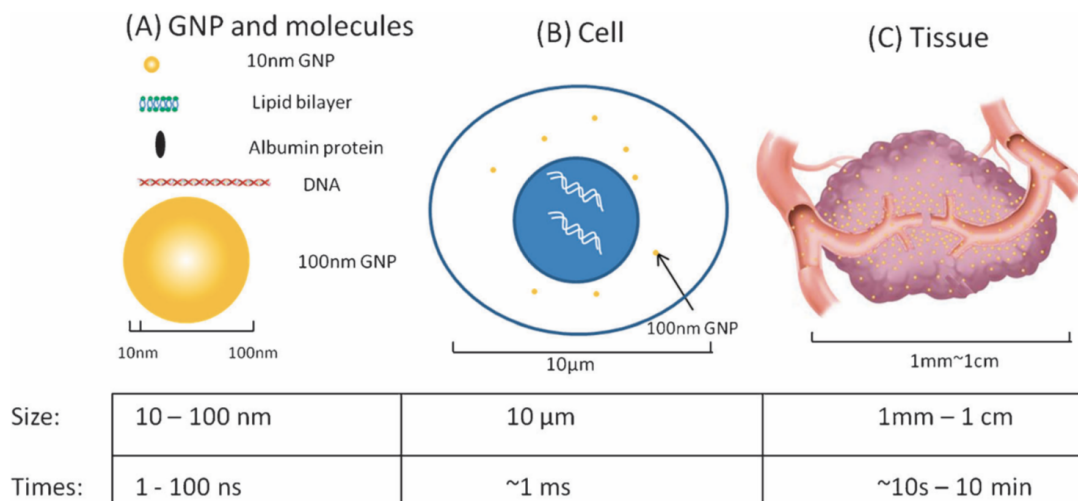


Figure 2.7 Échelle de temps de stabilisation autour de différents objet, sous l'influence d'une irradiation laser[4]

de nanoparticules d'or de différentes tailles dans l'oeil de souris. L'étude suggère que les nanoparticules d'or de 100nm ne parviennent pas à passer la barrière hémato-rétinienne qui ouvre la voie vers le cerveau et ne présentent pas de toxicité par rapport aux cellules de la rétine. Trois types de récepteurs spécifiques ont été identifiés sur les cellules Y79 : les récepteurs MRC2 et CD209, ainsi que le récepteur Ep-CAM[87, 53]. Une étude de faisabilité a été réalisée par Altundal et al.[88], pour étudier l'impact de l'utilisation de nanoparticules d'or de 2nm, en comparaison avec des nanoparticules de carboplatine, comme adjuvant pour un traitement de radiothérapie, visant la dégénérescence maculaire et le rétinoblastome. Des simulations Monte Carlo proposent d'investiguer l'impact de la concentration en NPs, mais aucun travail expérimental ne semble avoir été mené sur le sujet. Une étude originale, proposée par Remya et al.[89], utilise l'effet cytotoxique de nanoparticules d'argent pour ralentir la croissance des cellules de rétinoblastome. Cet effet cytotoxique est vraisemblablement lié à la libération d'ions dans le milieu environnant. L'étude montre par ailleurs que cet effet cytotoxique est fortement renforcé lors de l'utilisation de nanoparticules d'argent synthétisées de manière biologique, grâce à l'activité réductrice de l'algue brune *T. ornata*. Un groupe s'est aussi intéressé à la possibilité de faire de la thérapie génique en impliquant des nanoparticules d'or fonctionnalisées comme vecteur. La fonctionnalisation permet d'augmenter l'endocytose des nanoparticules porteuses de micro ARN et d'améliorer ainsi l'efficacité du traitement.[90]

Un article paru cette année ouvre également la voie vers l'investigation du traitement de rétinoblastome par traitement laser assisté par nanoparticules d'or. Le travail de Katchinskiy

et al. [87] explore l'utilisation *in vitro* d'un laser femtoseconde ainsi que de nanobâtons pour induire l'ablation des cellules de rétinoblastome. Les cellules Y79 sont ciblées grâce à la fonctionnalisation de nanobâtons d'or à l'aide d'anticorps anti-Epcam. Les cellules ont ensuite été irradiées avec un laser femtoseconde, recevant 20 pulses à une fluence de $1,45 \text{ TW.cm}^2$. Une mortalité cellulaire de 82 à 70%, selon le type de comptage, a ainsi été obtenue.

CHAPITRE 3 TRAITEMENT IN VITRO DU RETINOBLASTOME PAR HYPERTHERMIE

3.1 Présentation de la lignée cellulaire et du matériel utilisé

3.1.1 Lignée cellulaire Y79

Trois lignées cellulaires sont principalement utilisées pour les études *in vitro* sur le rétinoblastome : la lignée RBL-383, la lignée WERI-Rb1 et la lignée Y79[91]. Ces trois lignées cellulaires ont des comportements et des rythmes de croissance relativement différents. Tandis que la première est une lignée de cellules faiblement adhérentes, les deux autres sont des cellules en suspension. Les propriétés de croissance ultra-rapide des cellules Y79 les rendent particulièrement adaptées à des études qui porteraient sur l'influence d'un certain traitement sur leur prolifération[92]. La lignée cellulaire utilisée dans cette étude est celle des Y79 (ATCC HTB-18) qui sont cultivées dans le milieu de culture RPMI (*Life Technologies*), auquel on ajoute 10% de FBS (Foetal Bovin Serum) et 1% d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine). Ces cellules rondes, d'un diamètre allant de 10 à 12 μm , proviennent d'un donneur de sexe féminin âgé de deux ans et demi. Il s'agit de cellules en suspension qui ont une tendance naturelle à former des amas opaques dans le milieu de culture. La figure 3.1 a) donne un aperçu de ces amas. Bien que ces amas cellulaires soient bien moins denses que les tumeurs intravitréennes réelles, leur formation nous permet de nous intéresser à un système tridimensionnel qui apporte une nouvelle dimension au traitement *in vitro*, tant du point de vue de la répartition des nanoparticules que des conditions d'irradiation. Comme on le verra par la suite, la nature flottante des cellules Y79 entraîne cependant deux inconvénients majeurs pour la manipulation *in vitro* : d'une part la difficulté à séparer les cellules vivantes des cellules mortes, expliquant le 3 à 5 % de cellules mortes observé dans les contrôles, et d'autre part une difficulté accrue pour faire l'imagerie du système.

3.1.2 Nanoparticules utilisées

Les nanoparticules utilisées sont des nanoparticules d'or de 100nm, dont le pic plasmon est situé aux alentours de 570nm, ainsi que des nanoparticules d'alliage or-argent (AuAg 50 :50) d'environ 90nm de diamètre dont le pic plasmon est situé aux alentours de 510nm. Les premières ont été choisies pour leur relative biocompatibilité et le fait qu'elles présentent une section efficace d'absorption assez importante. Elles possèdent par ailleurs une section efficace de diffusion suffisamment importante pour que leur visualisation par microscopie soit directe,

que ce soit en utilisant une technique de microscopie en champ sombre, de rétrodiffusion ou d'illumination latérale. La visualisation des nanoparticules est un paramètre important pour mieux comprendre les phénomènes impliqués. Les secondes ont été utilisées car leur pic plasmon se situe plus proche de la résonance avec la longueur d'onde du laser utilisé. En revanche leur taille réduite leur permet d'absorber moins d'énergie. Les concentrations introduites sont similaires en terme de quantité de métal pour les deux solutions de nanoparticules. Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont non fonctionnalisées et se lient aux cellules grâce à une interaction électrostatique non spécifique. Les nanoparticules d'or de 100nm ont été achetées chez Nanopartz, et ont une concentration de 5.10^9 NPs/mL, tandis que les nanoparticules d'alliage ont été synthétisées au sein de notre laboratoire et ont été utilisées à une concentration similaire. Les propriétés plasmoniques de ces nanoparticules sont présentées plus en détail dans la figure 3.2.

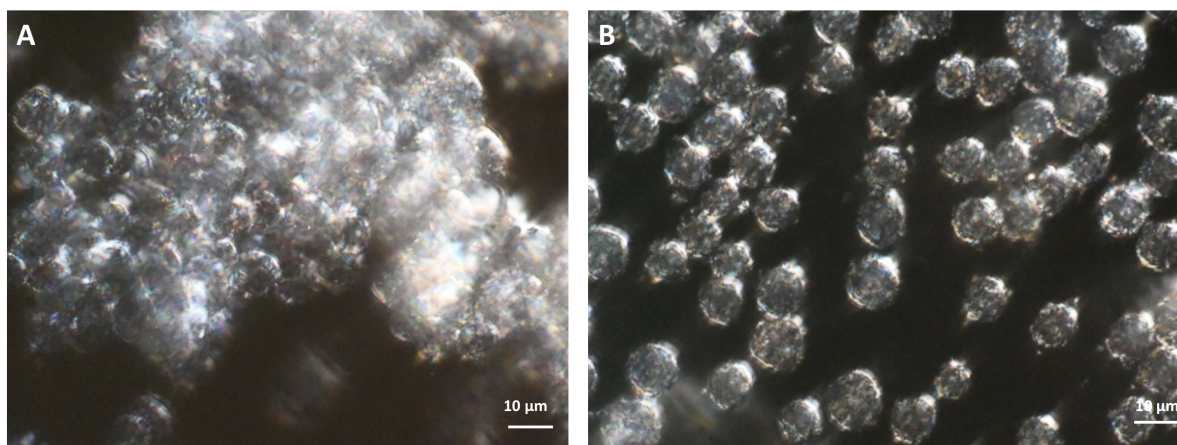


Figure 3.1 A - amas de cellules Y79 en suspension dans leur milieu de culture B - cellules Y79 artificiellement attachées avec la poly-L-lysine.

3.1.3 Préparation des échantillons

Toutes les études ont été réalisées avec une confluence cellulaire de $1,5.10^6$ cellules vivantes par mL, ainsi qu'une proportion de cellules mortes inférieure à 5%. Les cellules ont été incubées pendant 1h30 avec différentes concentrations de nanoparticules sous atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de CO_2 . Suite à l'incubation avec les nanoparticules, à la fois le contrôle (sans nanoparticules) et les échantillons testés ont été centrifugés à 200 g durant 7 min afin d'éliminer les nanoparticules non fixées aux cellules et re-suspendus dans 2 mL de milieu de culture propre. Par la suite, 1mL de la préparation obtenue est versé dans les pétris Ibidi grid-500, préalablement couverts de poly-L-lysine, dont le rôle est de forcer

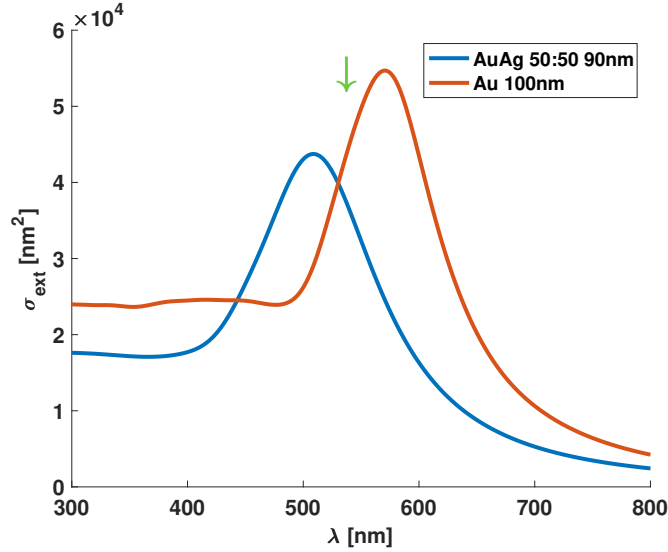


Figure 3.2 Spectres d'extinction des nanoparticules d'or et d'alliage utilisées. La flèche en haut indique la longueur d'onde d'irradiation du laser.

l'attachement des cellules au fond du pétri. Ces pétris, pourvus d'une grille, permettent de retrouver facilement la zone traitée. Les pétris sont laissés 1h dans l'incubateur avant de commencer l'irradiation afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond du pétri. La figure 3.1b) montre les cellules attachées au fond du pétri grâce à l'action de la poly-L-lysine. Il a été vérifié au préalable que la poly-L-lysine n'avait pas d'influence sur la viabilité des cellules. Lorsqu'il s'agit de puits μ Wells de chez Ibidi, les cellules sont re-suspendues dans 1,5mL pour monter leur concentration à 2.10^6 cellules/mL, et 300 μ L de la suspension obtenue sont versés par puits.

3.1.4 Montage expérimental et caractérisation du faisceau

Le montage expérimental utilisé, relativement simple, est présenté en figure 3.3a). Le laser nanoseconde est le Quanta 1 de chez *Quantum Light Instruments* (527nm, 7,7ns, 10Hz) et le laser continu est le Millenia Xs de chez *Spectra Physics* (532nm). La longueur d'onde a été choisie à cause de la possibilité de comparer facilement plusieurs régimes d'irradiation grâce aux deux lasers. Des polariseurs croisés motorisés permettent de contrôler la puissance du laser nanoseconde envoyée à l'échantillon. L'intégration du microscope permet à la fois une observation directe pendant l'irradiation et l'utilisation d'une platine motorisée (ProScan III, *Prior Scientific*) pour réaliser le balayage des échantillons dans les trois dimensions de l'espace. L'ensemble des équipements sont contrôlés par un logiciel Labview qui permet notamment de synchroniser le scan avec l'obturateur et d'éviter ainsi les effets de bord. Afin

de caractériser le faisceau du laser, un balayage 3D après focalisation par l'objectif a été réalisé. Ce balayage a permis d'évaluer le diamètre du faisceau à $2,3 \mu\text{m}$ au niveau du plan focal, ce qui est proche de la valeur théorique obtenue en prenant comme taille de faisceau la limite de résolution de l'objectif, à savoir $2,1 \mu\text{m}$. De la même manière, la distance de Rayleigh, sur laquelle la puissance surfacique peut être considérée comme globalement constante, est évaluée à environ $30 \mu\text{m}$, ce qui laisse une bonne marge de manoeuvre pour positionner le laser par rapport aux cellules.

3.1.5 Conditions d'irradiation et exploitation des résultats

Toutes les irradiations sont ensuite réalisées au sein d'un mini incubateur placé à même le microscope, permettant d'assurer des conditions contrôlées de température et de CO_2 pendant toute la durée de l'expérience (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Cela permet notamment d'assurer la survie des cellules non affectées par le traitement et de réaliser les études de re-prolifération dont il sera fait mention par la suite. La mort cellulaire induite est mesurée à l'aide d'iodure de propidium (PI), un marqueur fluorescent permettant de colorer les noyaux cellulaires des cellules mortes. Si la cellule est vivante, sa membrane est hermétique et ne permet pas au PI d'atteindre son noyau. En revanche, si la cellule est morte, le PI pénètre dans le noyau et fluoresce fortement dans le rouge. Après l'irradiation, environ $100 \mu\text{L}$ de PI à $300 \mu\text{M}$ sont ajoutés au pétri et incubés pendant 10min. Puis deux photographies des différentes zones irradiées sont prises, l'une à l'aide de filtres à fluorescence (cellules mortes) et l'autre par illumination en champ clair (totalité des cellules) afin d'établir la proportion de cellules mortes. Les images obtenues sont exploitées à l'aide du logiciel ImageJ.

3.2 Résultats

3.2.1 Toxicité des nanoparticules

La toxicité des nanoparticules a été estimée à l'aide du marqueur d'activité cellulaire PrestoBlue[®]. Il s'agit d'un marqueur colorimétrique faisant intervenir un couple oxydant-réducteur. Lors de l'activité cellulaire, le réactif initialement de couleur bleue, est réduit en son réducteur conjugué, de couleur rouge. Une simple mesure d'absorbance permet donc de comparer des niveaux d'activité cellulaire. Comme le montre la figure 3.4 A, l'incubation de cellules avec des NPs à différentes concentrations n'a pas permis d'établir la toxicité desdites nanoparticules *in vitro*, ce qui ne préjuge en rien de leur éventuelle toxicité *in vivo* mais permet d'assurer que les résultats présentés par la suite sont bien issus de l'action conjointe du laser et des nanoparticules et non des nanoparticules seules.

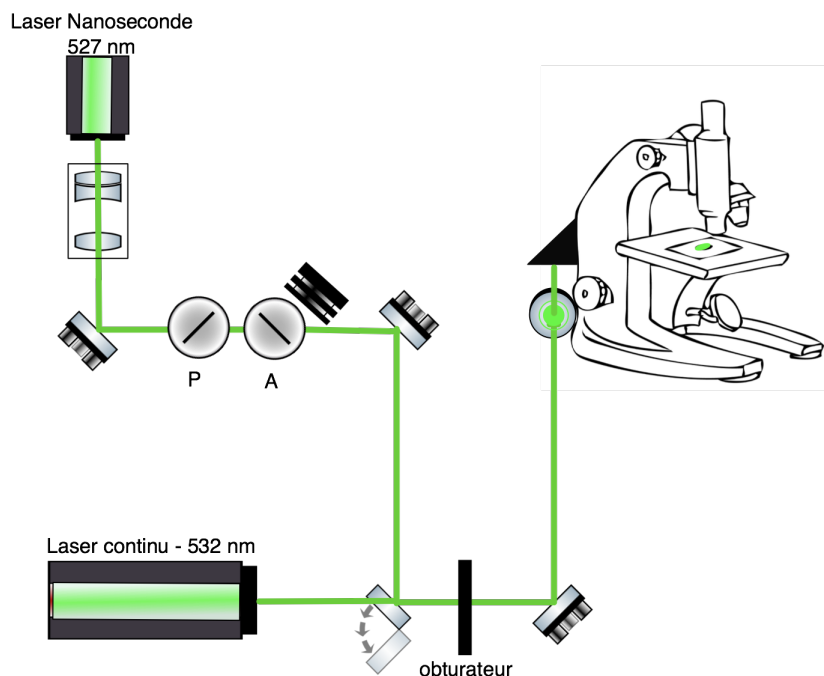


Figure 3.3 Montage expérimental. Un miroir amovible permet d'échanger facilement le laser nanoseconde contre le laser continu. Les polariseur/analyseur, l'obturateur et la platine du microscope sont contrôlés par ordinateur et synchronisés par un logiciel Labview.

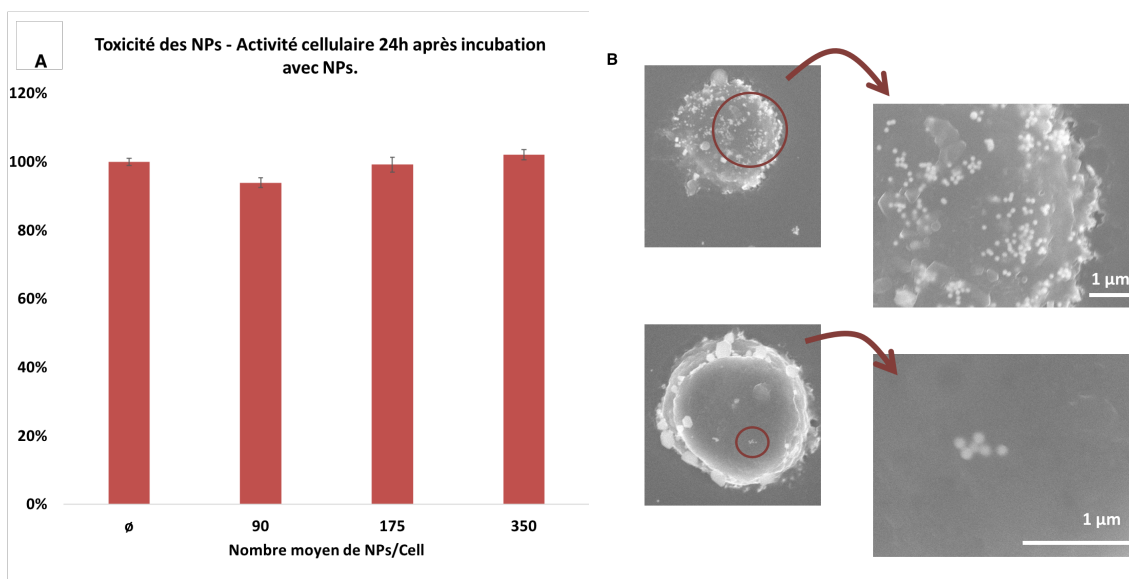


Figure 3.4 A - Activité cellulaire après 24h d'incubation avec différentes concentrations de AuNPs 100nm, sans irradiation laser. L'activité cellulaire est normalisée par rapport au contrôle (\emptyset NPs); B - Images SEM d'une cellule morte surchargée de nanoparticules (haut) et d'une cellule vivante (bas) après le même temps d'incubation avec des NPs. Les sphères blanches visibles à la surface des cellules sont des nanoparticules d'or de 100nm.

3.2.2 Détermination de la concentration finale en NPs

Les cellules incubées avec les nanoparticules ayant été centrifugées afin d'éliminer les nanoparticules non fixées aux cellules, il est nécessaire d'estimer la concentration restante de nanoparticules contenue dans l'échantillon. Plusieurs pistes ont été envisagées, telle qu'un dosage par absorbance ou l'imagerie tridimensionnelle des cellules préparées comme mentionné ci-dessus. La deuxième option a finalement été retenue car considérée comme plus représentative de la réalité. Pour réaliser le dosage, les cellules ont été incubées avec les nanoparticules puis centrifugées comme expliqué précédemment. Elles ont ensuite été re-suspendues dans de l'eau distillée. Le surnageant récupéré a, lui, été centrifugé à 5 000 g pendant 5 min, puis re-suspendu dans de l'eau distillé. Les spectres des deux solutions obtenues, ainsi que celui d'une solution à la concentration initiale de nanoparticules (avant centrifugation donc) sont mesurés à l'aide du spectromètre Epoch. Le rapport d'amplitude des spectres obtenus devait permettre ensuite d'estimer les concentrations relatives des différents échantillons. La même expérience est reproduite sans cellules afin de déterminer la part des nanoparticules restant dans l'échantillon à cause de l'opération de centrifugation elle-même. Malheureusement, le manque de précision du spectromètre utilisé a empêché d'obtenir des résultats concluants. Le balayage 3D des échantillons a donc été privilégié. Les images ont été réalisées à l'aide d'un objectif 60x à immersion dans l'huile, d'une ouverture numérique de 1,27, en rétro-diffusion, avec un pas de 0,1 μm . Le mouvement selon z est commandé par un accessoire du contrôleur de platine ProScan III de chez Prior Scientifique. L'exploitation des images obtenues se fait à l'aide du logiciel ImageJ. Le tableau 3.1 montre les résultats de l'incubation de cellules avec des nanoparticules pour différentes concentrations initiales en nanoparticules. Une douzaine de cellules par condition ont été sélectionnées pour faire cette estimation.

Tableau 3.1 Nombre de NPs moyen par cellule en fonction de la concentration initiale en NPs, après 1h30 d'incubation. V_{NPs} est le volume ajouté, C_{NPs} la concentration en NPs après dilution et $N_{Av/Ap}$ le nombre moyen de nanoparticules par cellule avant et après centrifugation des échantillons à 200g pendant 7min.

$V_{NPs}[\mu\text{L}]$	100	50	25	15
$C_{NPs}[\text{NPs/mL}]$	8e3	4e3	2e3	1e3
$N_{Av}[\text{NPs/Cell}]$	350	175	90	45
$N_{Ap}[\text{NPs/Cell}]$	40-50	20 - 30	10 - 20	< 5

Une composante non négligeable de l'attachement des nanoparticules aux cellules est le constat que les cellules mortes naturellement présentes dans les échantillons, ayant une membrane cellulaire poreuse, vont piéger la plupart des nanoparticules. Une estimation grossière réalisée à partir d'images SEM laisse à croire à l'existence d'un facteur 10 entre la quantité

moyenne de nanoparticules piégées à la surface et à l'intérieur des cellules mortes par rapport aux cellules vivantes. La figure 3.4 B donne un exemple de deux cellules provenant d'un même échantillon sans traitement laser, l'une morte et l'autre vivante. Cette information aura notamment un impact non négligeable pour la mise en place d'un traitement avec des impulsions relativement longues.

3.2.3 Irradiation avec laser nanoseconde

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'utilisation du laser nanoseconde pour induire la mort cellulaire.

Influence de la puissance du laser

L'influence de la puissance du laser sur la mort cellulaire est résumée par la figure 3.5. La figure 3.5a) est une photographie du signal en fluorescence de la zone irradiée. Les échantillons contenant des nanoparticules ont été préparés en incubant 100 μ L de NPs avec $1,5 \cdot 10^6$ cellules en suspension pendant 1h30. La confluence cellulaire est globalement homogène sur toute la surface du p \acute{e} tri et les points rouges sont des cellules ayant internalisé l'iodure de propidium, donc des cellules mortes. La présence de cellules mortes en dehors de la zone irradiée s'explique par l'incapacité de séparer les cellules mortes des cellules vivantes dans une culture de cellules en suspension. Le pourcentage de cellules mortes dans les contrôles varie de 3 à 6%, ce qui reste dans les normes de ce qui est observé pour cette lignée cellulaire. Le meilleur résultat obtenu est de $82\% \pm 2\%$ pour une densité de puissance moyenne de $50\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. À l'échelle d'une cellule, on observe une dé-stabilisation de la membrane cellulaire ainsi que la disparition de certaines nanoparticules. La figure 3.6 donne un aperçu de la membrane cellulaire avant et après irradiation. L'utilisation de la microscopie en rétro-diffusion permet également de visualiser les nanoparticules d'une taille supérieure à 50nm. En ce qui concerne l'utilisation du laser nanoseconde, étant donné le faible taux de répétition du laser, aucune accumulation d'énergie n'est observée d'une impulsion à l'autre. Par ailleurs, la durée de l'impulsion ne permet pas un chauffage à l'échelle cellulaire. On se dirige donc vers une solution faisant intervenir une déstabilisation de la membrane cellulaire suffisamment importante pour conduire à sa mort, autrement dit de la photoablation. L'hypothèse privilégiée est l'induction d'un phénomène de cavitation autour des nanoparticules irradiées. Aux fluences utilisées dans cette étude les nanoparticules ne sont probablement pas conservées intactes. Des expériences ont été menées en utilisant la puissance théorique permettant de rester en deçà du point de fusion des nanoparticules mais n'ont pas permis d'induire la mort cellulaire de façon significative.

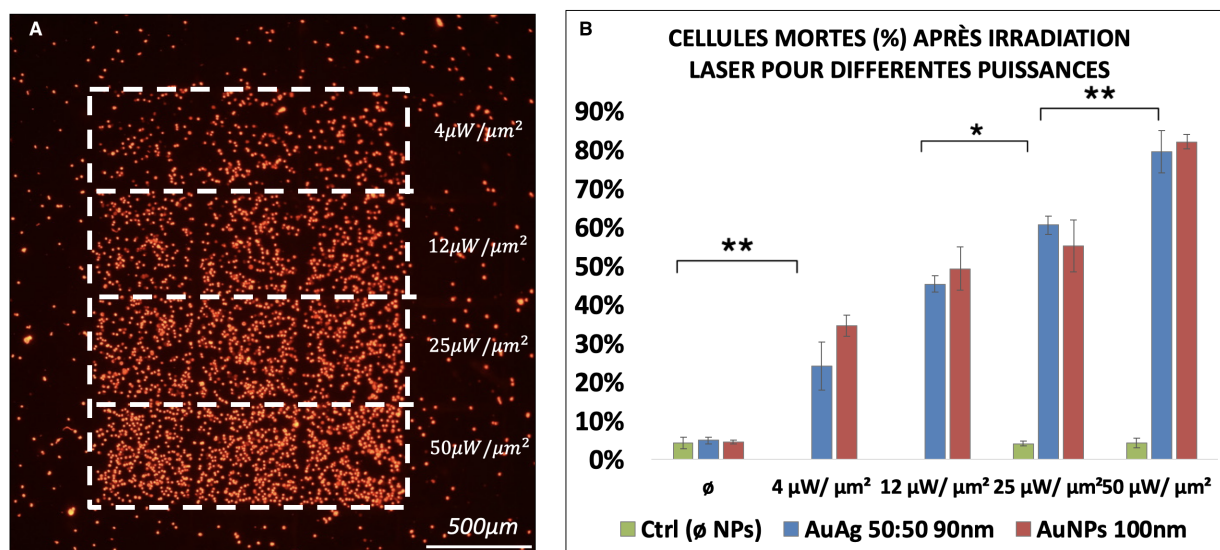


Figure 3.5 Influence de la puissance d'irradiation sur la mortalité cellulaire, A - cellules mortes marquées au PI (en rouge), 4X-0,1NA ; B - mortalité cellulaire 10 min après l'irradiation laser, pour deux types de nanoparticules et sans nanoparticules (contrôle). Test ANOVA One-Way, avec correction de Bonferroni : ** $p < 0,01$ et * $p < 0,5$.

Influence du type de nanoparticule et de leur concentration.

Dans la mesure où l'une des grandes préoccupations des traitements impliquant des nanoparticules métalliques est le devenir desdites nanoparticules après le traitement, le but de cette étude était d'estimer la quantité minimale de nanoparticules nécessaire par cellule pour induire leur mort. De plus, il est avéré que l'un des défis des traitements intravitréens est la capacité des agents thérapeutiques à atteindre leur cible. Des études réalisées *in vivo* sur l'injection de nanoparticules d'or dans l'oeil de rats dans le cadre d'un autre projet, nous ont permis de constater qu'une grosse partie des nanoparticules restait bloquée au niveau du site de l'injection. Il est donc d'autant plus important que le traitement fonctionne en présence de relativement peu d'agents de contrastes. Nous avons également voulu savoir si la composition des nanoparticules pouvait influencer le traitement. Comme on peut le voir sur la figure 3.5b), l'utilisation de nanoparticules d'alliage (AuAg NPs) n'a pas permis d'établir une différence significative en termes de pourcentage de cellules mortes pour des conditions d'irradiation similaires. Les cellules en suspension ont ensuite été incubées avec différentes concentrations de nanoparticules durant 1h30 (voir tableau 3.1). Puis elles ont été centrifugées de la manière habituelle. Le nombre de nanoparticules moyen par cellule a ensuite été déterminé de la manière décrite précédemment. L'irradiation a été réalisée à une fluence

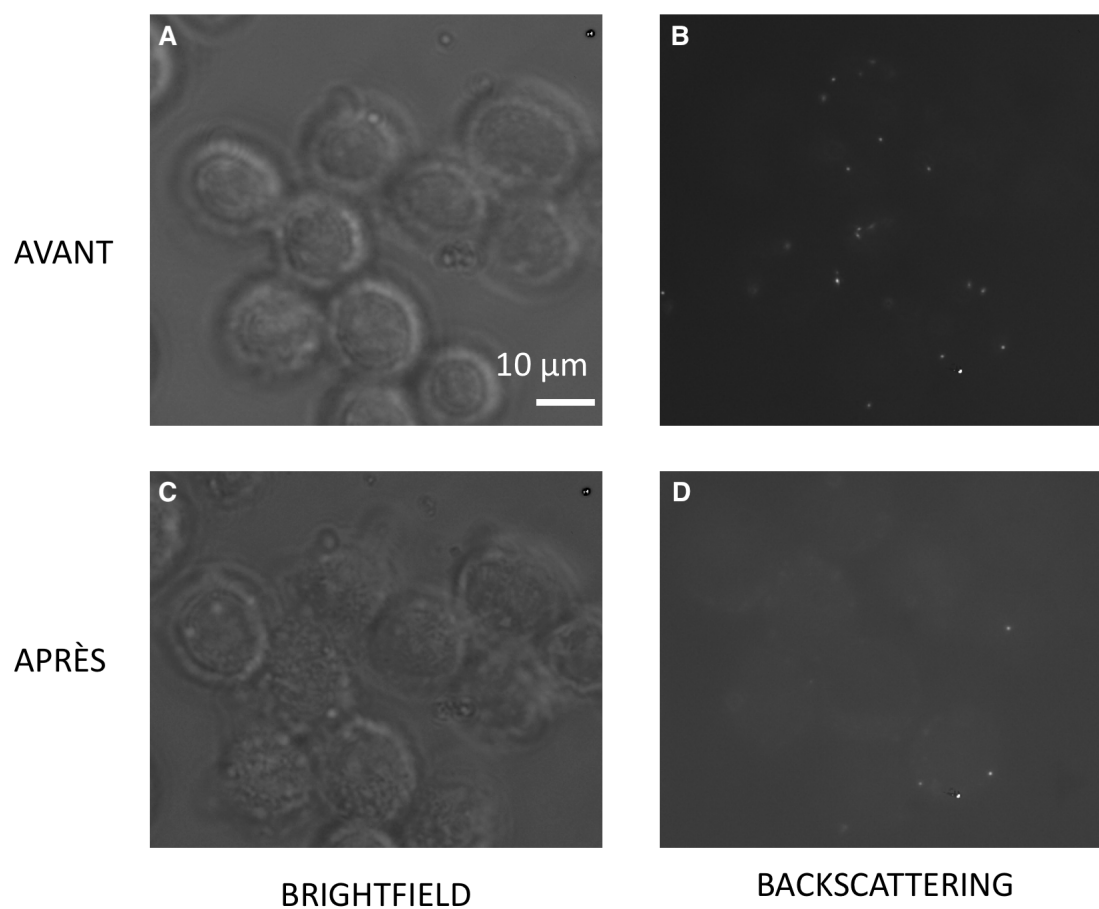


Figure 3.6 Aspect de la membrane cellulaire avant (A et C) et après irradiation (B et D), 60X-1,27NA. La microscopie en champ clair permet de visualiser les cellules (A et C) tandis que grâce à la rétro diffusion de la lumière, les nanoparticules AuNPs 100nm sont observables par microscopie optique (C et D).

moyenne de $50 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. Les résultats sont présentés dans la figure 3.7.

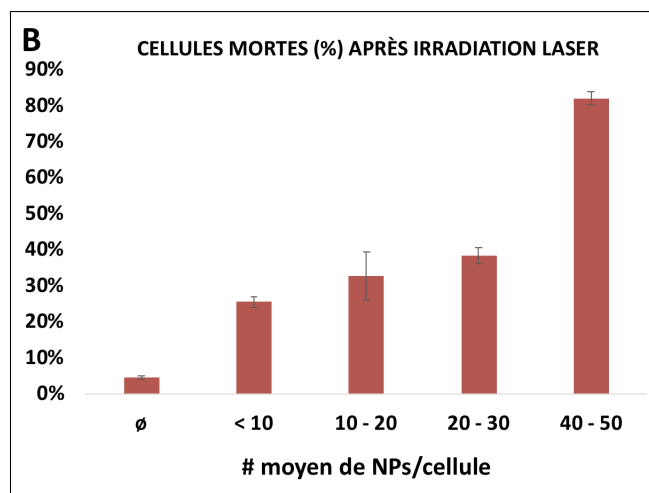


Figure 3.7 Influence de la concentration de NPs. L'irradiation a été menée avec une puissance moyenne de $50 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$.

Reprolifération cellulaire

Au delà de la mort cellulaire immédiate observée et quantifiée précédemment, il nous fallait également s'assurer que le stress induit par l'irradiation laser n'était pas suffisant pour provoquer la mort cellulaire par apoptose quelques heures après l'irradiation, à la fois dans les échantillons contrôle et test. Cela permettait également de déterminer un niveau d'irradiation en dessous duquel la prolifération cellulaire reprend le dessus. Comme dans le cas de la figure 3.5, les échantillons contenant des nanoparticules ont été préparés en incubant $100 \mu\text{L}$ de NPs avec $1,5 \cdot 10^6$ cellules en suspension pendant 1h30. La figure 3.8 montre qu'en ce qui concerne l'échantillon contrôle sans nanoparticules, pas de différence significative n'est observée 18h après irradiation entre les zones irradiées par le laser et les zones non irradiées, ce qui prouve qu'aucun stress létal n'est induit par le laser en l'absence de nanoparticules. En ce qui concerne les échantillons contenant des nanoparticules, aucune condition d'irradiation ne permet d'observer une augmentation significative de la mort cellulaire 18h après irradiation, ce qui laisse à penser que, là encore, aucun stress menant à l'apoptose des cellules n'est provoqué. Il est toutefois à noter que des tests plus précis concernant la signalisation cellulaire seraient nécessaires pour poser un diagnostic certain. On remarque par ailleurs qu'en deçà de $4 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ la prolifération cellulaire est suffisante pour augmenter la proportion de cellules vivantes dans les zones irradiées 18h après irradiation.

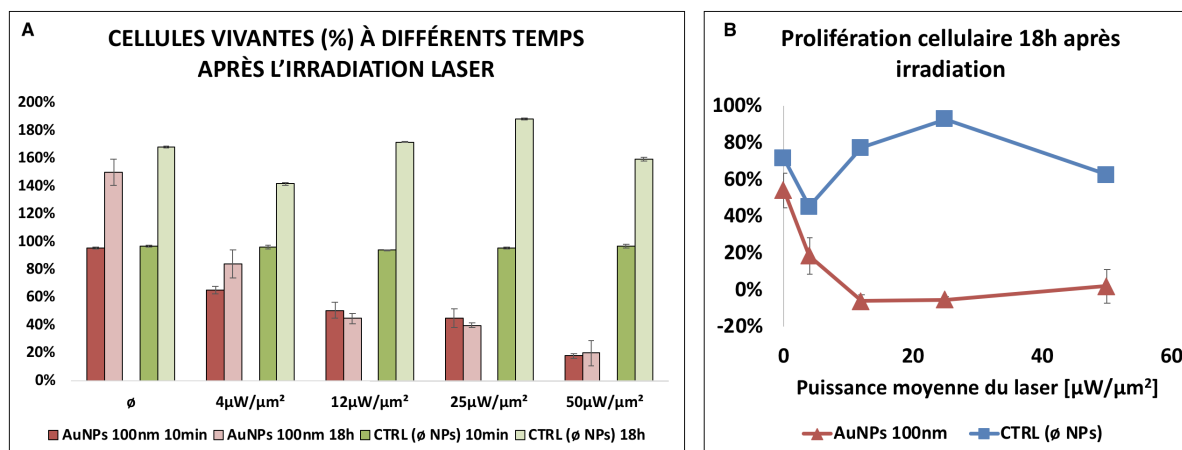


Figure 3.8 A - Pourcentage de cellules vivantes 10 min et 18h après irradiation (rapporté au nombre de cellules vivantes à $t=0$) B - Prolifération cellulaire (%) 18h après irradiation pour différentes puissances moyennes de laser.

3.2.4 Irradiation avec laser CW

L'objectif principal de l'utilisation d'un laser continu était de trouver des conditions d'irradiation permettant de conserver l'intégrité des nanoparticules. Une attention particulière a donc été accordée au fait d'utiliser des puissances n'induisant pas une élévation de température à la surface d'une nanoparticule au delà du point de fusion, estimé à 1600°C . Une conséquence directe de cette exigence était l'augmentation du temps d'irradiation, afin d'obtenir un chauffage suffisamment étendu pour avoir un impact au niveau cellulaire. D'après la littérature, cela implique d'utiliser des temps d'irradiation de l'ordre de la ms au minimum. Les paramètres évalués dans cette section-ci sont la fluence laser et la vitesse de balayage de l'échantillon, mais aussi l'influence du nombre moyen de nanoparticules par cellule.

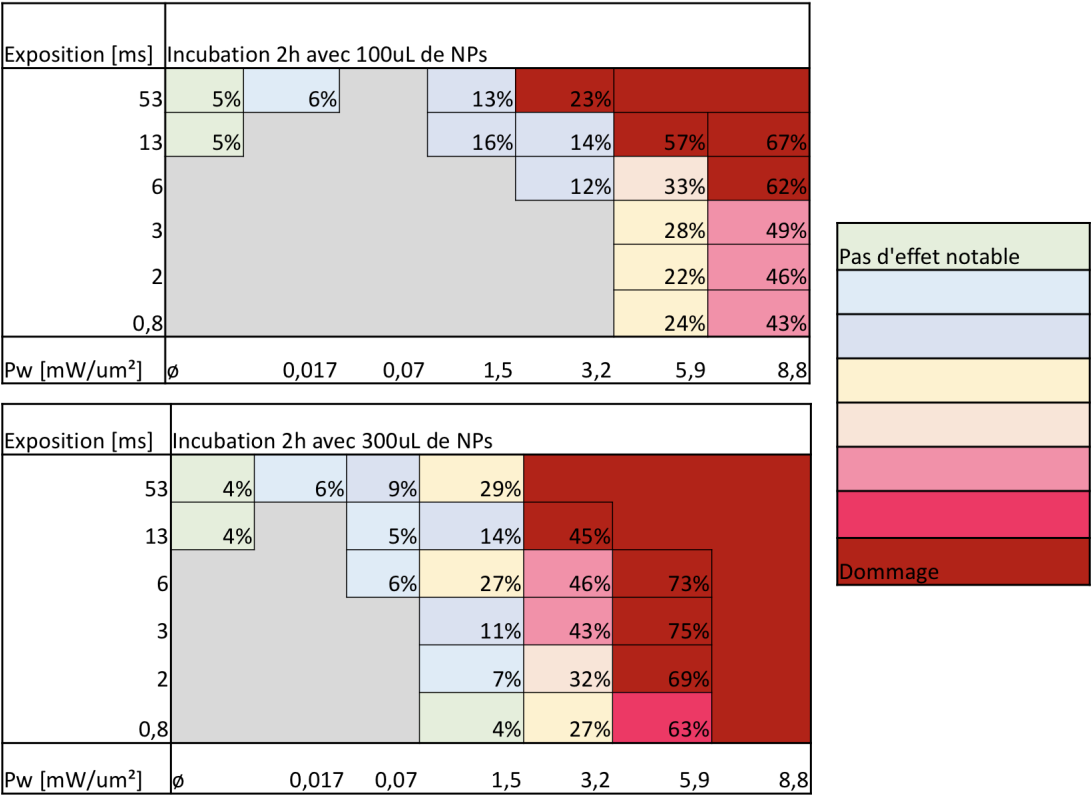
Influence de la puissance surfacique et du temps d'irradiation

Afin d'avoir une chance d'observer un chauffage global au niveau de la cellule, les vitesses de scan utilisées ont fait varier le temps d'exposition au laser entre 0,8 et 58ms. Les deux premières puissances utilisées ($0,017$ et $0,07 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$) correspondent à l'intervalle de puissances usuellement utilisées pour la photocoagulation. On constate sur la figure 3.9, dans le tableau du haut (colonnes 1 et 2), que ces puissances ne suffisent pas à induire la mort cellulaire de façon significative, même pour des temps d'exposition de l'ordre de 60ms. Cela pourrait s'expliquer par la trop petite quantité de nanoparticules à l'intérieur du faisceau laser pour induire un chauffage global. Nous avons donc augmenté la puissance laser jusqu'à

une puissance théorique permettant d'atteindre, d'après les équations présentées dans la revue de littérature, 1000K à la surface de chaque nanoparticule (dernière colonne). Cependant, il est rapidement apparu que pour des temps d'exposition trop longs on induisait des dommages apparents dans le milieu (surface du pétri en polymère endommagé et/ou apparition de bulles) tandis que des temps d'exposition plus courts ne permettaient pas d'atteindre des niveaux satisfaisants de mort cellulaire. Dans un second temps, nous avons donc essayé d'augmenter considérablement la quantité de nanoparticules à la surface des cellules.

Influence de la concentration en nanoparticules

Étonnamment, augmenter la concentration en nanoparticules n'a pas permis d'améliorer grandement les performances du traitement, comme on peut le constater sur la figure 3.9, tableau du bas. En effet, si une puissance plus faible était bel et bien nécessaire pour obtenir un pourcentage de cellules mortes similaire dans l'échantillon, l'apparition de bulles macroscopique au sein de l'échantillon s'est également produit bien plus tôt. Cela s'explique par le fait qu'augmenter le temps d'incubation ou la concentration en nanoparticules aura davantage tendance à augmenter la quantité de nanoparticules captées par les cellules mortes que celles disponibles à la surface des cellules vivantes. Lorsque le laser passe au niveau d'une cellule morte chargée de nanoparticules le chauffage est donc très intense, alors qu'il ne suffit pas nécessairement à tuer la majorité des cellules vivantes, pourvues de peu de nanoparticules. On peut donc en conclure que, sous les conditions décrites ci-dessus, le recours à un laser continu pour induire un chauffage à l'échelle cellulaire ne semble pas être indiqué. D'autres conditions pourraient toutefois être soumises à investigation. On pourrait d'une part fonctionnaliser les nanoparticules, pour essayer d'améliorer l'attachement des nanoparticules aux cellules vivantes, et augmenter leur potentiel de chauffage. Une autre option serait d'agrandir la largeur du faisceau, mais on perdrait alors en précision. Pour finir, pour ce type de chauffage, la meilleure solution consisterait sans doute à s'orienter vers d'autres types de nanoparticules, plus efficaces, tels que des nano-bâtons ou des nano-coquilles.



CHAPITRE 4 REALISATION D'UN SUBSTITUT DU CORPS VITRÉ ET ÉTUDE DE FAISABILITÉ DANS L'OEIL

4.1 Motivation et hypothèses

Assez rapidement, la nécessité de réaliser les expériences dans un environnement plus représentatif de la réalité s'est imposé. Il s'agissait en effet de répondre à deux questions principales : est-il possible pour les nanoparticules de se rendre à destination dans un milieu visqueux ? La puissance d'irradiation nécessaire pour induire la mort cellulaire est-elle la même dans ce nouvel environnement ? Ces questions nous ont permis de constater que les réponses dépendraient essentiellement des propriétés physiques du milieu de substitution, et notamment de ses propriétés rhéologiques. Nous avons donc opté pour une modélisation relativement simple du corps vitré composée d'acide hyaluronique et de milieu de culture RPMI. Le milieu de culture devait rendre possible la culture cellulaire des Y79 tandis que la concentration en acide hyaluronique déterminerait la viscosité de l'hydrogel obtenu.

4.2 Caractérisation du substitut du corps vitré

4.2.1 Propriétés rhéologiques

Afin de caractériser le gel obtenu, des mesures ont été réalisées au CREPEC, le centre de recherche sur les systèmes polymères et composites à haute performance, sur des échantillons contenant différentes concentrations d'acide hyaluronique. Ces mesures ont ensuite été comparées à diverses données trouvées dans la littérature. Les mesures réalisées, montrées en figure 4.1, ont permis de constater que, aux concentrations qui nous intéressent, la viscosité et la concentration en acide hyaluronique de l'échantillon sont liées par une relation affine. La viscosité du corps vitré la plus faible relevée dans la littérature est d'environ 1,6cP, ce qui correspond à une concentration de 0,5 mg/mL en acide hyaluronique. Les concentrations présentées ici ont été utilisées par la suite pour évaluer l'impact de la viscosité sur le traitement proposé, qui dans notre cas sera comprise entre 1,6 et 15cP.

4.2.2 Croissance des cellules dans le simili corps vitré

Il a été vérifié, à l'aide du marqueur d'activité cellulaire PrestoBlue®, que l'utilisation d'acide hyaluronique pour préparer le gel ne ralentit pas la prolifération des cellules, après 24h et 48h d'incubation, comme le montre la figure 4.2. Par ailleurs des îlots de cellules similaires à

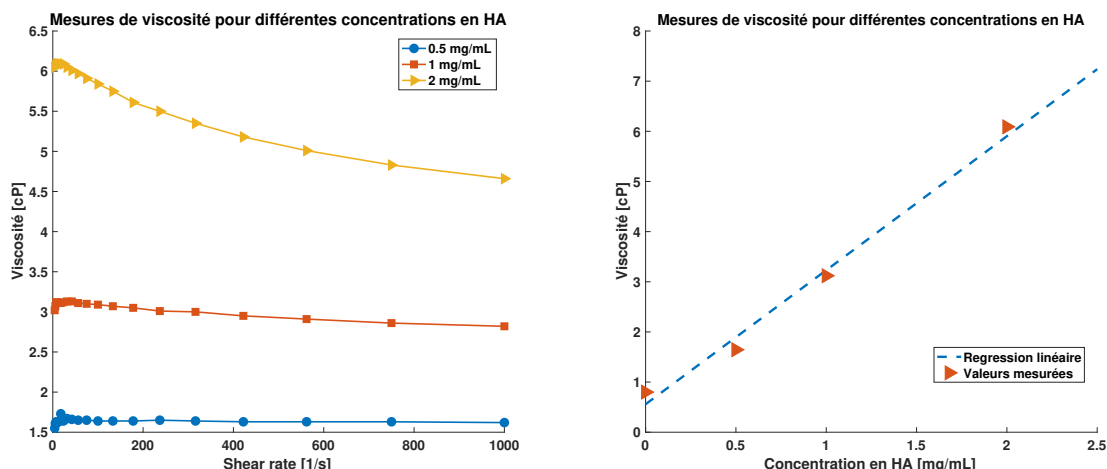


Figure 4.1 Mesures de viscosité pour différentes concentrations d'acide hyaluronique. Ces résultats sont comparables aux mesures de viscosité faites dans le vitré par Silva et al.[5]

ceux observés dans le milieu de culture ont été obtenus.

4.2.3 Incubation des NPs avec les amas cellulaires dans le simili-corps vitré

Les cellules Y79 ont tout d'abord été cultivées pendant 48h dans le simili corps vitré à 4mg/mL afin de leur permettre de croître en formant des amas. Puis des NPs ont été ajoutées dans des proportions similaires à ce qui a été fait précédemment. Trois heures plus tard, un scan suivant z des amas cellulaires a été réalisé afin de vérifier si les NPs se rendaient jusqu'aux cellules. La figure 4.3 montre que non seulement les NPs parviennent jusqu'aux cellules malgré la viscosité du milieu, mais encore que l'on retrouve des nanoparticules d'or jusqu'au centre des amas. Quelques extraits d'un scan 3D réalisé sur environ $40\mu\text{m}$ est disponible dans la figure 4.3.

4.3 Résultat de l'irradiation de cellules Y79 dans un environnement visqueux

4.3.1 Préparation des échantillons et méthode

Dans un premier temps, et afin de mieux contrôler l'attachement des nanoparticules sur les cellules, l'incubation des nanoparticules s'est faite dans le milieu de culture classique dans des conditions similaires aux expériences présentées précédemment. Les cellules ont ensuite été centrifugées (200g, 7min) puis placées dans des pétris couverts de poly-L-lysine. Après une heure d'incubation environ, le milieu de culture a été retiré et remplacé par le simili-corps vitré à différentes viscosités. L'irradiation a ensuite été réalisée pour différentes fluences, le

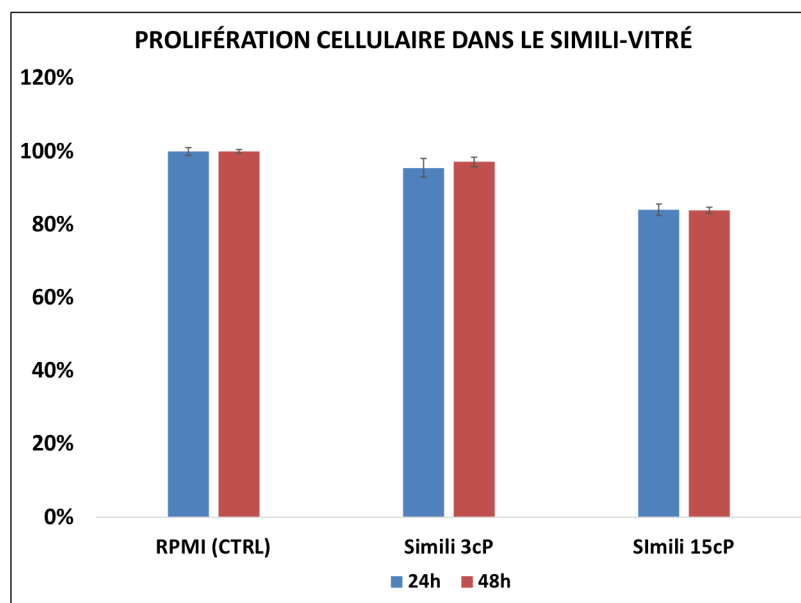


Figure 4.2 Étude de prolifération des cellules dans le gel sur 48h. Normalisation par rapport au contrôle (RPMI).

tout dans un environnement contrôlé à 5% de CO_2 et 37° . À la suite de l'irradiation, la mort cellulaire a été attestée à l'aide d'iodure de propidium.

4.3.2 Irradiation pour différentes concentrations en acide hyaluronique

On a pu constater que l'augmentation de la viscosité a un impact positif sur le traitement proposé. Il semblerait en effet que pour des concentrations similaires en nanoparticules et une même fluence d'irradiation, la proportion de cellules mortes obtenue augmente avec la viscosité du milieu. Une hypothèse permettant d'expliquer cela est que la viscosité modifie la dynamique des bulles créées et permet ainsi d'atteindre les cellules de manière plus efficace. La figure 4.4 reprend les principaux résultats obtenus pour différentes viscosités de gel.

4.3.3 Irradiation dans un volume

Après avoir établi les résultats présentés précédemment, il était important de prouver que le traitement conservait de bons résultats dans un volume. L'irradiation a été faite dans un volume de $70 \mu\text{L}$ prélevés dans la culture de cellules formée d'amas et incubée pendant 2h avec les nanoparticules. Puis l'irradiation a été réalisée dans le milieu de culture classique avec et sans nanoparticules puis dans le vitré avec et sans nanoparticules. Suite à l'irradiation la mort cellulaire est évaluée grâce au bleu de trypan et le comptage est fait grâce à un

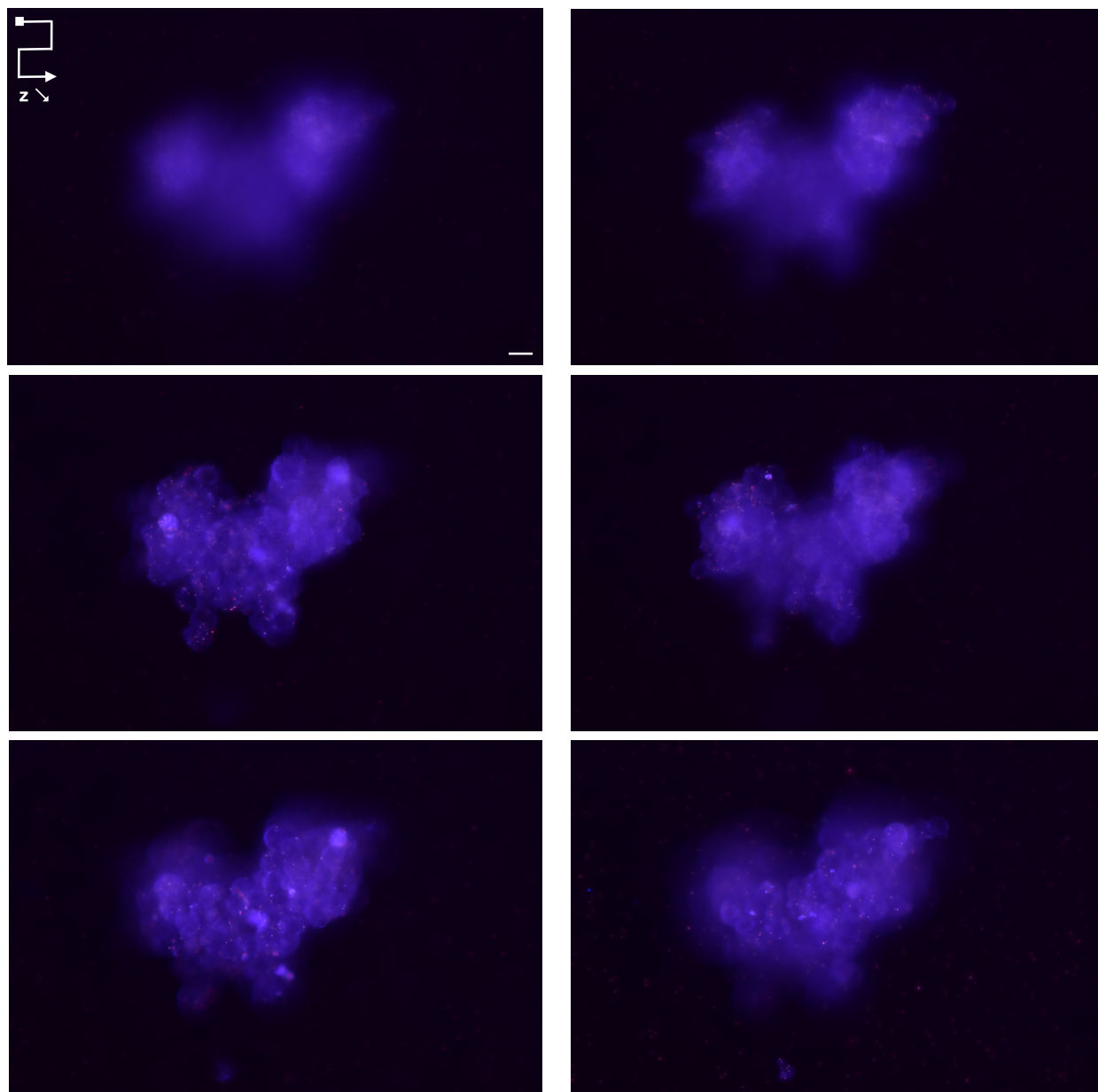


Figure 4.3 Extrait du balayage en z d'un amas cellulaire décoré de nanoparticules, la barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$. Les images sont à lire dans le sens indiqué en haut à gauche de la figure, chaque image (plan xy) correspondant à une nouvelle valeur de z espacée de $10\mu\text{m}$ de la précédente. Les cellules apparaissent en bleu violacé (indigo) et les nanoparticules en magenta. L'amas total s'étale sur une cinquantaine de micromètres

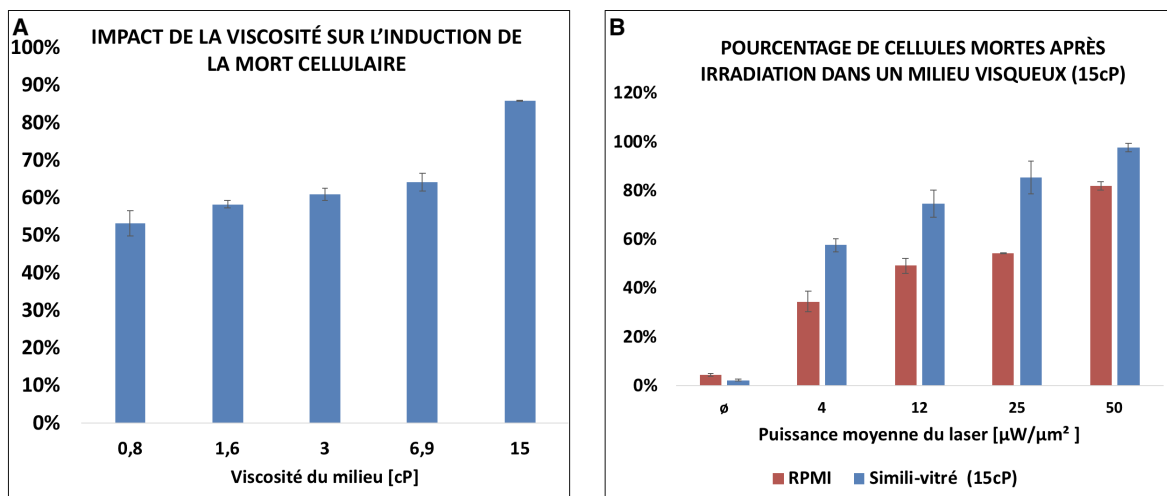


Figure 4.4 Influence de la concentration en acide hyaluronique A - différentes viscosités de gel, irradiation à $25\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$, B - Comparaison avec les résultats obtenus dans le milieu de culture seul.

hémocytomètre. Les résultats sont présentés dans la figure 4.5a. Au cours de l'irradiation on peut par ailleurs remarquer d'une part que les amas cellulaires restent bien formés et d'autre part qu'il y a un net changement d'aspect des cellules qui, une fois mortes, se mettent à diffuser la lumière différemment (4.5b). L'irradiation a été réalisée avec une puissance surfacique moyenne de $2\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. Il est intéressant de constater que la quantité de cellules tuées pour cette fluence est supérieure à ce qui avait été trouvé avec les cellules artificiellement attachées avec la poly-L-lysine. Cela peut s'expliquer par le fait que la proximité entre les cellules est beaucoup plus grande et qu'une impulsion permet donc possiblement d'impacter plusieurs cellules à la fois. L'imagerie tridimensionnelle en fluorescence d'un des amas après irradiation, disponible dans l'Annexe A, permet de constater que l'on retrouve bien des cellules mortes jusqu'au coeur des îlots de cellules. À nouveau, aucune mort cellulaire significative n'est observée dans les contrôles.

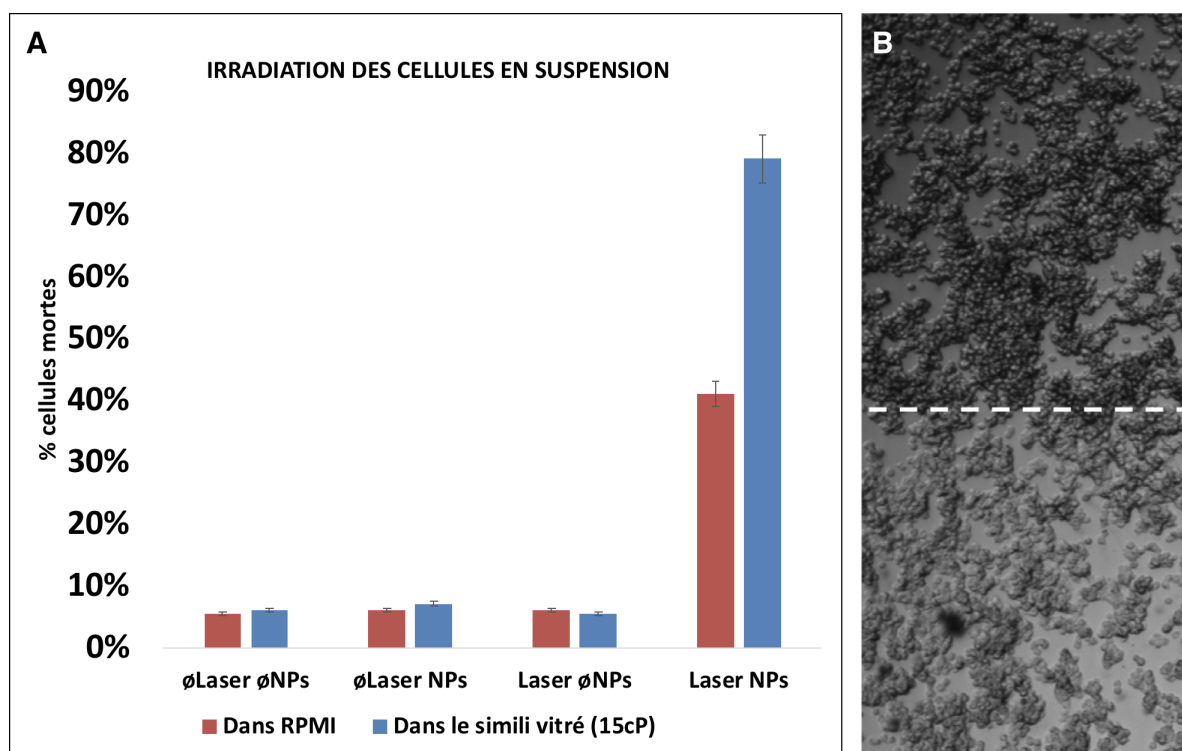


Figure 4.5 A - Irradiation des cellules Y79 en suspension dans un volume pour une puissance surfacique moyenne de $2\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$; B - Photographie des amas cellulaires pendant l'irradiation : la délimitation entre la zone non irradiée (haut) et la zone irradiée (bas) est très nette.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

5.1 Discussion des résultats obtenus et de leur exportabilité vers un modèle *in vivo*

5.1.1 Influence de la viscosité

D'après les puissances utilisées, l'hypothèse principale expliquant l'induction de mort cellulaire est la production de bulle sous l'effet de l'action conjuguée du laser et des nanoparticules. Afin d'expliquer la différence de mortalité après irradiation dans le gel et dans le milieu de culture classique, nous avons donc cherché les différentes dynamiques de la cavitation dans des environnements visqueux. Quelques groupes de recherche se sont intéressés à l'influence de la viscosité sur le phénomène de cavitation induite par laser. Les recherches de Brujan et al.[93] concernant la cavitation dans des solutions de polymères et de Xiu-Mei et al.[94] pour des mélanges eau-glycérol de différentes viscosités semblent conduire aux conclusions suivantes :

- Le rayon maximal des bulles produites diminue
- Les taux de croissance et d'explosion des bulles diminuent
- Le rayon minimal des bulles produites augmente
- Le temps de demi-vie des bulles produites augmente

On peut ainsi supposer que le gel agit comme un rempart contre la propagation de l'onde de choc, dont l'énergie va donc se dissiper de manière plus localisée et principalement vers la membrane cellulaire. Si l'impact de la viscosité sur les dommages produits au niveau de la membrane cellulaire peut être considéré comme positif, il faut garder à l'esprit que ce même gel va probablement s'avérer une barrière supplémentaire à franchir pour les nanoparticules. S'il semble que les nanoparticules parviennent en effet à se rendre jusqu'au centre des amas cellulaire dans les expériences menées, il ne faut pas oublier que le modèle proposé ne reflète que partiellement la structure du corps vitré. En effet, la viscosité choisie pour faire l'étude est sans doute plus proche de celle de la phase aqueuse que de la phase gel à proprement parler du corps vitré. L'étude ne tient donc pas compte du transport des nanoparticules à travers cette phase gel. Par ailleurs, il est difficile de savoir quel est l'impact de la maladie elle-même sur la viscosité de l'humeur vitrée et seules des données qualitatives sont disponibles dans la littérature. Pour finir, le léger flux observé dans l'oeil n'a pas pu être reproduit et il est difficile d'estimer son impact sur le transport des nanoparticules. Il faut également rappeler que les amas cellulaires sur lesquels nous avons travaillé sont probablement beaucoup moins denses que les tumeurs réelles. Il faut donc s'attendre à une difficulté accrue d'atteindre le centre

des tumeurs dans une situation réelle, ce qui favorise bel et bien une solution nécessitant la présence de relativement peu de nanoparticules à la surface des cellules.

5.1.2 Choix des nanoparticules et fonctionnalisation

Deux points principaux en ce qui concerne les nanoparticules sont à retenir de ce travail. Le premier est que beaucoup plus de nanoparticules s'accumulent dans les cellules mortes que dans les cellules vivantes, et le deuxième que la solution proposée ne permet pas de préserver l'intégrité des nanoparticules. Une manière d'améliorer le ciblage des cellules par les nanoparticules serait d'avoir recours à la fonctionnalisation. Cela permettrait peut être de ré-équilibrer la quantité de nanoparticules adhérant à la surface des cellules vivantes et celle piégée à l'intérieur et à la surface des cellules mortes et ainsi de reconsidérer l'utilisation d'impulsions de l'ordre de la ms pour induire un chauffage à l'échelle cellulaire. Bien que la toxicité des nanoparticules et leur élimination par le système immunitaire qu'elles soient fragmentées ou non, n'ait pas clairement été établie *in vivo*, un des avantages serait notamment de trouver des niveaux d'énergie conduisant à des températures en deçà du point de fusion des nanoparticules. Une autre possibilité serait de se diriger vers l'utilisation de nanoparticules plus efficaces d'un point de vue de la conversion d'énergie en chaleur telles que les nanoparticules de type coeur-couronne (Si@Au) ou les nanobâtons. Par ailleurs, la fonctionnalisation des nanoparticules et le ciblage spécifique des cellules Y79 serait quoiqu'il en soit une étape-clef pour la progression vers les études *in vivo* puisque c'est précisément ce qui garantirait la spécificité du traitement proposé.

5.2 Comparaison avec la vitréolyse et considérations géométriques

Comme expliqué dans la revue de littérature, la vitréolyse est une technique de traitement laser ayant pour but de vaporiser les fibres qui s'accumulent dans le corps vitré, aussi appelées "mouches", et qui gênent le champ de vision pour une durée parfois prolongée. Elle fait intervenir un laser pulsé nanoseconde Nd :YAG et des impulsions de fortes intensités (1 à 12mJ par impulsion) dans le but de provoquer un claquage optique dans l'eau. L'enjeu principal étant de ne pas venir toucher la rétine afin de ne pas endommager la vision, différentes lentilles chirurgicales peuvent être utilisées afin d'augmenter l'ouverture numérique disponible pour atteindre le centre de l'oeil, diminuer la dimension du faisceau au plan focal tout en augmentant sa divergence et gagner ainsi en précision d'intervention. Un faisceau de 8 μm de diamètre au plan focal est généralement utilisé. La technique que nous proposons ici se rapproche fortement de cette solution existante en termes d'ingénierie du système optique. En effet il existe d'ores et déjà des systèmes commercialisés permettant à la fois la visualisa-

tion des objets à supprimer et l'irradiation laser et ce pour différents emplacements au sein du corps vitré (voir table 5.1). L'introduction de nanoparticules d'or nous permet par ailleurs d'abaisser considérablement la fluence utilisée (100 à 5000x) pour atteindre le but poursuivi, à savoir l'élimination des cellules cancéreuses du rétinoblastome, ce qui est très encourageant en termes de faisabilité.

Tableau 5.1 Liste des lentilles chirurgicales utilisable en fonction de l'emplacement des objets visés dans le vitré, Ocular Instruments, Bellevue.

lentille	magn. de l'image	magn. du laser	site du plan focal
Peyman Widefield 12,5mm	1,40x	0,71x	vitré antérieur
Peyman Widefield 18mm	1,41x	0,71x	milieu du vitré
Peyman Widefield 25mm	1,36x	0,74x	vitré postérieur

CHAPITRE 6 CONCLUSION

6.1 Synthèse des travaux

Dans cette étude nous avons donc cherché des conditions admissibles pour un traitement laser assisté de nanoparticules d'or des cellules en suspension Y79. Dans un premier temps, afin de simplifier le système étudié, un polymère a été utilisé afin de disposer les cellules à la surface d'un pétri. Sous ces conditions, divers paramètres ont été soumis à investigation comme l'influence du type de laser, la concentration en nanoparticules et la puissance moyenne utilisée. Nous avons ainsi démontré que l'utilisation d'un laser nanoseconde à une puissance de $50\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ *in vitro*, conjugué à l'utilisation de nanoparticules d'or de 100nm à hauteur d'environ 30 à 40 NPs par cellule, pouvait tuer jusqu'à 82% des cellules Y79 attachées dans un pétri, avec une re-prolifération quasiment nulle 18h après l'irradiation. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la fabrication d'un simili-corps vitré, constitué d'acide hyaluronique, un composé naturellement présent dans le vitré, et de milieu de culture RPMI. La caractérisation de ce corps vitré s'est faite grâce à des mesures de viscosité dont les valeurs ont été comparées à celles de la littérature. Même s'il est avéré que certaines zones du vitré ont une viscosité bien supérieure à ces valeurs, une bonne adéquation avec la phase constituée principalement d'acide hyaluronique a été trouvée. En reproduisant les expériences qui avait été faites dans un premier temps, on a pu démontrer que l'augmentation de la viscosité de l'environnement cellulaire avait un impact positif sur l'issue du traitement, et permettait d'augmenter la mort cellulaire pour des conditions d'incubation avec les nanoparticules et d'irradiation similaires. Pour finir, le traitement a été réalisé dans un volume, avec les amas cellulaires déjà formés. Nous avons ainsi pu observer que, malgré la viscosité, on retrouvait bel et bien des nanoparticules jusqu'au centre des amas. Par ailleurs la plus grande proximité entre les cellules a aussi eu un effet positif sur le traitement. Pour une fluence de $0,2\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$, nous sommes ainsi parvenu à tuer environ 80% des cellules se trouvant dans le volume irradié. Cette fluence est de 100 à 500 fois plus faible que les fluences usuellement utilisées pour la vitréolyse, variant de 24 à $140\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$.

6.2 Limitations de la solution proposée

La principale limitation de la solution proposée réside dans la non préservation de l'intégrité des nanoparticules après traitement. Il n'a en effet pas été possible d'obtenir de bons résultats de mort cellulaire avec des fluences permettant de rester sous le point de fusion des nanopar-

ticules d'or. Cette limitation peut être nuancée par le fait que l'on ne sait pas exactement si le fait de fragmenter les nanoparticules aura un effet bien plus dommageable que le fait de garder des nanoparticules d'or intactes *in situ*. Il existe en effet une possibilité que leur endocytose par cellules du système immunitaire en devienne d'autant plus aisé. Des études de toxicité doivent donc être menées pour déterminer l'impact de la fragmentation des nanoparticules sur la viabilité cellulaire. Par ailleurs, une solution alternative consisterait à utiliser des nanoparticules de type coeur-couronne ayant une meilleure capacité à convertir l'énergie en chaleur, ou encore un laser pulsé ayant un taux de répétition plus élevé, permettant ainsi l'accumulation d'énergie d'une impulsion à l'autre.

6.3 Améliorations futures

Parmi les améliorations futures on peut citer la fonctionnalisation des nanoparticules utilisées à l'aide des anticorps correspondant aux récepteurs identifiés MRC2, CD209 et Ep-CAM. Cette fonctionnalisation, associée à une co-culture permettrait de valider la spécificité du traitement. De plus, certaines études d'un point de vue de la signalisation cellulaire seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes biologiques entrant en jeu suite à l'irradiation.

Par ailleurs, malgré les efforts réalisés pour se rapprocher d'un système réaliste, le chemin à parcourir avant d'atteindre un traitement effectif du rétinoblastome est encore long. Une première étape pourrait être la réalisation d'une étude ex-vivo, sur un oeil porcin par exemple, dont les propriétés sont relativement proches de l'oeil humain. Cela permettrait d'avoir une meilleure compréhension de la diffusion des nanoparticules dans un environnement visqueux.

RÉFÉRENCES

- [1] D. Goddé-Joly et J.-L. Dufier, *Ophtalmologie pédiatrique*. Elsevier Masson, 1992, ch. Développement du globe oculaire et de l’orbite au cours de l’enfance, p. 12–23.
- [2] J. Sebag, “Anatomie et physiologie du vitré et de l’interface vitréorétinienne,” vol. 5, p. 1–25, 2008.
- [3] S. Patskovsky, E. Bergeron, D. Rioux, M. Simard et M. Meunier, “Hyperspectral reflected light microscopy of plasmonic au/ag alloy nanoparticles incubated as multiplex chromatic biomarkers with cancer cells,” *The Analyst*, vol. 139, n°. 20, p. 5247–5253, 2014.
- [4] Z. Qin et J. C. Bischof, “Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, n°. 3, p. 1191–1217, 2012.
- [5] A. F. Silva, M. A. Alves et M. S. N. Oliveira, “Rheological behaviour of vitreous humour,” *Rheologica Acta*, vol. 56, n°. 4, p. 377–386, feb 2017.
- [6] J. Yun, Y. Li, C.-T. Xu et B.-R. Pan, “Epidemiology and rb1 gene of retinoblastoma,” *International journal of ophthalmology*, vol. 4, n°. 1, p. 103, 2011.
- [7] B. P. David Lyden, Danny R. Welch, *Cancer Metastasis : Biologic Basis and Therapeutics*. Cambridge University Press, 2011, ch. Retinoblastoma, p. 264–277.
- [8] L. Desjardins, “Diagnostic et traitement actuel du rétinoblastome,” *Cancer/Radiotherapy*, vol. 3, p. 98s–101s, 1999.
- [9] C. L. Shields, A. Mashayekhi, A. K. Au, C. Czyz, A. Leahey, A. T. Meadows et J. A. Shields, “The international classification of retinoblastoma predicts chemoreduction success.” *Ophthalmology*, vol. 113, p. 2276–2280, déc. 2006.
- [10] V. Mangematin et S. Walsh, “The future of nanotechnologies,” *Technovation*, vol. 32, n°. 3-4, p. 157–160, mar 2012.
- [11] U. Kreibig et M. Vollmer, *Optical properties of metal clusters*, S. series in materials science, édit. Springer, 1995.
- [12] Q. Fu et W. Sun, “Mie theory for light scattering by a spherical particle in an absorbing medium,” *Applied Optics*, vol. 40, n°. 9, p. 1354, mar 2001.
- [13] V. D. Krishna, K. Wu, D. Su, M. C. Cheeran, J.-P. Wang et A. Perez, “Nanotechnology : Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety,” *Food Microbiology*, vol. 75, p. 47–54, oct 2018.

- [14] D. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. Payne et J. L. West, "Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles," *Cancer Letters*, vol. 209, n° 2, p. 171–176, jun 2004.
- [15] H. Cheng, D. Huo, C. Zhu, S. Shen, W. Wang, H. Li, Z. Zhu et Y. Xia, "Combination cancer treatment through photothermally controlled release of selenous acid from gold nanocages," *Biomaterials*, vol. 178, p. 517–526, sep 2018.
- [16] C. Wang, Y. Wang, L. Zhang, R. J. Miron, J. Liang, M. Shi, W. Mo, S. Zheng, Y. Zhao et Y. Zhang, "Pretreated macrophage-membrane-coated gold nanocages for precise drug delivery for treatment of bacterial infections," *Advanced Materials*, vol. 30, n° 46, p. 1804023, oct 2018.
- [17] A. M. Wilson, J. Mazzaferri, Bergeron, S. Patskovsky, P. Marcoux-Valiquette, S. Costantino, P. Sapieha et M. Meunier, "In vivo laser-mediated retinal ganglion cell optoporation using k, javax.xml.bind.jaxbelement@e53c4e7, 1.1 conjugated gold nanoparticles." *Nano letters*, oct. 2018.
- [18] D. Bhavsar, K. Subramanian, S. Sethuraman et U. M. Krishnan, "Management of retinoblastoma : opportunities and challenges," *Drug Delivery*, p. 1–9, mar 2015.
- [19] T. V. Chirila et Y. Hong, "Chapter c2 the vitreous humor," dans *Handbook of Biomaterial Properties*. Springer New York, 2016, p. 125–134.
- [20] S. Donati, S. M. Caprani, G. Airaghi, R. Vinciguerra, L. Bartalena, F. Testa, C. Mariotti, G. Porta, F. Simonelli et C. Azzolini, "Vitreous substitutes : The present and the future," *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 1–12, 2014.
- [21] P. Sharif-Kashani, J.-P. Hubschman, D. Sassoon et H. P. Kavehpour, "Rheology of the vitreous gel : Effects of macromolecule organization on the viscoelastic properties," *Journal of Biomechanics*, vol. 44, n° 3, p. 419–423, feb 2011.
- [22] J. Park, P. M. Bungay, R. J. Lutz, J. J. Augsburger, R. W. Millard, A. Sinha Roy et R. K. Banerjee, "Evaluation of coupled convective-diffusive transport of drugs administered by intravitreal injection and controlled release implant," *J Control Release*, vol. 105, n° 3, p. 279–95, Jul 2005.
- [23] A. Loewenstein, E. Zemel, Y. Vered, M. Lazar et I. Perlman, "Retinal toxicity of gentamicin after subconjunctival injection performed adjacent to thinned sclera," *Ophthalmology*, vol. 108, p. 759–764, 2001.
- [24] S. M. Jang, K. E. Cardone, T. D. Nolin, D. L. Mason et D. W. Grabe, "Determination of vancomycin and gentamicin clearance in an in vitro, closed loop dialysis system," *BMC Nephrology*, vol. 15, 2014.

- [25] M. S. Stay, J. Xu, T. W. Randolph et V. H. Barocas, "Computer simulation of convective and diffusive transport of controlled-release drugs in the vitreous humor." *Pharmaceutical research*, vol. 20, p. 96–102, janv. 2003.
- [26] W. S. Duke-Elder, "The physico-chemical properties of the vitreous body." *The Journal of physiology*, vol. 68, p. 155–165, oct. 1929.
- [27] F. A. Jilani, Z. Hussein et N. Ahmed, "Ascorbic acid and physico-chemical properties of vitreous humour." *Indian journal of ophthalmology*, vol. 35, p. 320–326, 1987.
- [28] C. Alovizi, C. Panico, U. de Sanctis et C. M. Eandi, "Vitreous substitutes : Old and new materials in vitreoretinal surgery." *Journal of ophthalmology*, vol. 2017, p. 3172138, 2017.
- [29] S. Mertens, J. Bednarz et K. Engelmann, "Evidence of toxic side effects of perfluorohexyloctane after vitreoretinal surgery as well as in previously established in vitro models with ocular cell types." *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, vol. 240, p. 989–995, déc. 2002.
- [30] J. L. Federman et H. D. Schubert, "Complications associated with the use of silicone oil in 150 eyes after retina-vitreous surgery." *Ophthalmology*, vol. 95, p. 870–876, juill. 1988.
- [31] M. P. Kummer, J. J. Abbott, S. Dinser et B. J. Nelson, "Artificial vitreous humor for in vitro experiments," *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2007, p. 6407–10, 2007.
- [32] T. Kivelä, K. Tuppurainen, P. Riikonen et M. Vapalahti, "Retinoblastoma associated with chromosomal 13q14 deletion mosaicism." *Ophthalmology*, vol. 110, p. 1983–1988, oct. 2003.
- [33] A. G. Knudson, "Mutation and cancer : statistical study of retinoblastoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 68, p. 820–823, avr. 1971.
- [34] C. J. Dommering, T. Marees, A. H. van der Hout, S. M. Imhof, H. Meijers-Heijboer, P. J. Ringens, F. E. van Leeuwen et A. C. Moll, "Rb1 mutations and second primary malignancies after hereditary retinoblastoma." *Familial cancer*, vol. 11, p. 225–233, juin 2012.
- [35] A. Dhami, A. Bansal et V. Khetan, "Retinoblastoma : An overview of modern management." *Nepalese journal of ophthalmology : a biannual peer-reviewed academic journal of the Nepal Ophthalmic Society : NEPJOPH*, vol. 9, p. 1–12, janv. 2017.
- [36] M. V. Parulekar, "Retinoblastoma — current treatment and future direction," *Early Human Development*, vol. 86, n^o. 10, p. 619–625, oct 2010.

- [37] J. A. Shields, H. Parsons, C. L. Shields et M. E. Giblin, "The role of cryotherapy in the management of retinoblastoma," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 108, n^o. 3, p. 260–264, sep 1989.
- [38] C. L. Shields, M. C. Santos, W. Diniz, K. Gündüz, G. Mercado, J. R. Cater et J. A. Shields, "Thermotherapy for retinoblastoma." *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, vol. 117, p. 885–893, juill. 1999.
- [39] A. Agarwal, N. G. Thaker, B. Tawk, P. K. Allen, D. R. Grosshans, C. E. Herzog, D. S. Gombos et A. Mahajan, "The evolution of radiation therapy for retinoblastoma : The MD anderson cancer center experience," *International Journal of Particle Therapy*, vol. 2, n^o. 4, p. 490–498, mar 2016.
- [40] T. E. Merchant, C. J. Gould, M. W. Wilson, N. E. Hilton, C. Rodriguez-Galindo et B. G. Haik, "Episcleral plaque brachytherapy for retinoblastoma," *Pediatric Blood & Cancer*, vol. 43, n^o. 2, p. 134–139, 2004.
- [41] A. N. Pandey, "Retinoblastoma : An overview," *Saudi Journal of Ophthalmology*, vol. 28, n^o. 4, p. 310–315, oct 2014.
- [42] E. M. Pritchard, M. A. Dyer et R. K. Guy, "Progress in small molecule therapeutics for the treatment of retinoblastoma," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 16, n^o. 6, p. 430–454, feb 2016.
- [43] F. Ahmed, M. J. Ali et A. K. Kondapi, "Carboplatin loaded protein nanoparticles exhibit improve anti-proliferative activity in retinoblastoma cells," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 70, p. 572–582, sep 2014.
- [44] D. Kalita, D. Shome, V. G. Jain, K. Chadha et J. R. Bellare, "In vivo intraocular distribution and safety of periocular nanoparticle carboplatin for treatment of advanced retinoblastoma in humans," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 157, n^o. 5, p. 1109–1115.e2, may 2014.
- [45] S. Parveen et S. K. Sahoo, "Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma," *Cancer Nanotechnol*, vol. 1, n^o. 1-6, p. 47–62, 2010.
- [46] Y. Inokuchi, K. Hironaka, T. Fujisawa, Y. Tozuka, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Takeuchi et H. Hara, "Physicochemical properties affecting retinal drug/coumarin-6 delivery from nanocarrier systems via eyedrop administration," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, n^o. 6, p. 3162, jun 2010.
- [47] K. Hironaka, T. Fujisawa, H. Sasaki, Y. Tozuka, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara et H. Takeuchi, "Fluorescence investigation of the retinal delivery of hydrophilic compounds

- via liposomal eyedrops,” *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 34, n° 6, p. 894–897, 2011.
- [48] Q. Qiu, C. Yang, W. Xiong, H. Tahiri, M. Payeur, R. Superstein, A.-S. Carret, P. Hamel, B. Ellezam, B. Martin, M. Vezina, P. Sapieha, G. Liu et P. Hardy, “SYK is a target of lymphocyte-derived microparticles in the induction of apoptosis of human retinoblastoma cells,” *Apoptosis*, vol. 20, n° 12, p. 1613–1622, sep 2015.
- [49] J. Walther, S. Schastak, S. Dukic-Stefanovic, P. Wiedemann, J. Neuhaus et T. Claudépierre, “Efficient photodynamic therapy on human retinoblastoma cell lines,” *PLoS ONE*, vol. 9, n° 1, p. e87453, jan 2014.
- [50] R. Teixeira, M. Laranjo, A. M. Abrantes, G. Brites, A. Serra, R. Proença et M. F. Botelho, “Retinoblastoma : might photodynamic therapy be an option ?” *Cancer metastasis reviews*, vol. 34, p. 563–573, déc. 2015.
- [51] I. Aerts, P. Leuraud, J. Blais, A. lise Pouliquen, P. Maillard, C. Houdayer, J. Couturier, X. Sastre-Garau, D. Grierson, F. Doz et M. F. Poupon, “In vivo efficacy of photodynamic therapy in three new xenograft models of human retinoblastoma,” vol. 7, p. 275–283, 2010.
- [52] U. E. K. Schnurrbusch, “Complications after photodynamic therapy,” *Archives of Ophthalmology*, vol. 123, n° 10, p. 1347, oct 2005.
- [53] A. Gallud, D. Warther, M. Maynadier, M. Sefta, F. Poyer, C. D. Thomas, C. Rouxel, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, A. Morere, L. Raehm, P. Maillard, J. O. Durand, M. Garcia et M. Gary-Bobo, “Identification of mrc2 and cd209 receptors as targets for photodynamic therapy of retinoblastoma using mesoporous silica nanoparticles,” *RSC Adv.*, vol. 5, n° 92, p. 75 167–75 172, 2015.
- [54] M. Gary-Bobo, Y. Mir, C. Rouxel, D. Brevet, O. Hocine, M. Maynadier, A. Gallud, A. Da Silva, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, S. Richeter, B. Looock, P. Maillard, A. Morère, M. Garcia, L. Raehm et J.-O. Durand, “Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma : Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy,” *Int J Pharm*, vol. 432, n° 1-2, p. 99–104, Aug 2012.
- [55] D. V. Palanker, “Fifty years of ophthalmic laser therapy,” *Archives of Ophthalmology*, vol. 129, n° 12, p. 1613, dec 2011.
- [56] W.-J. Cho, D. H. Kessel et H.-R. Kim, “Photodynamic therapy : the role of paraptosis,” 2018.
- [57] D. K. Newman, “Photodynamic therapy : current role in the treatment of chorioretinal conditions,” vol. 30, p. 202–210, 2016.

- [58] P. Rundle, “Photodynamic therapy for eye cancer.” *Biomedicines*, vol. 5, déc. 2017.
- [59] D. H. Ghodasra et H. Demirci, “Photodynamic therapy for choroidal metastasis,” *American Journal of Ophthalmology*, vol. 161, p. 104–109.e2, jan 2016.
- [60] D. P. Sendrowski et M. A. Bronstein, “Current treatment for vitreous floaters.” *Optometry (St. Louis, Mo.)*, vol. 81, p. 157–161, mars 2010.
- [61] R. Milston, M. C. Madigan et J. Sebag, “Vitreous floaters : Etiology, diagnostics, and management.” *Survey of ophthalmology*, vol. 61, p. 211–227, 2016.
- [62] J. Kokavec, Z. Wu, J. C. Sherwin, A. J. Ang et G. S. Ang, “Nd :yag laser vitreolysis versus pars plana vitrectomy for vitreous floaters.” *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. 6, p. CD011676, juin 2017.
- [63] C. P. Shah et J. S. Heier, “Yag laser vitreolysis vs sham yag vitreolysis for symptomatic vitreous floaters : A randomized clinical trial.” *JAMA ophthalmology*, vol. 135, p. 918–923, sept. 2017.
- [64] W. F. Tsai, Y. C. Chen et C. Y. Su, “Treatment of vitreous floaters with neodymium yag laser.” *The British journal of ophthalmology*, vol. 77, p. 485–488, août 1993.
- [65] S. Baillif, V. Paoli, C. Francheschetti et P. Gastaud, “[retinal injury following nd-yag laser treatment of symptomatic vitreous floaters].” *Journal francais d’ophtalmologie*, vol. 34, p. 589–591, oct. 2011.
- [66] S. A. Abdelkawi, A. M. Abdel-Salam, D. F. Ghoniem et S. K. Ghaly, “Vitreous humor rheology after nd :yag laser photo disruption.” *Cell biochemistry and biophysics*, vol. 68, p. 267–274, mars 2014.
- [67] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West et R. Drezek, “Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy,” *Nano Letters*, vol. 5, n°. 4, p. 709–711, apr 2005.
- [68] V. K. Pustovalov, “Theoretical study of heating of spherical nanoparticle in media by short laser pulses,” *Chemical Physics*, vol. 308, n°. 1-2, p. 103–108, jan 2005.
- [69] N. Nedyalkov, S. Imamova, P. Atanasov, R. Toshkova, E. Gardeva, L. Yossifova, M. Alexandrov et M. Obara, “Interaction of gold nanoparticles with nanosecond laser pulses : Nanoparticle heating,” *Applied Surface Science*, vol. 257, n°. 12, p. 5456–5459, apr 2011.
- [70] M. Strasser, K. Setoura, U. Langbein et S. Hashimoto, “Computational modeling of pulsed laser-induced heating and evaporation of gold nanoparticles,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, n°. 44, p. 25 748–25 755, oct 2014.

- [71] P. Keblinski, D. G. Cahill, A. Bodapati, C. R. Sullivan et T. A. Taton, “Limits of localized heating by electromagnetically excited nanoparticles,” *Journal of Applied Physics*, vol. 100, n°. 5, p. 054305, sep 2006.
- [72] H. Yamauchi, S. Ito, K. ichi Yoshida, T. Itoh, Y. Tsuboi, N. Kitamura et H. Miyasaka, “Temperature near gold nanoparticles under photoexcitation : Evaluation using a fluorescence correlation technique,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 117, n°. 16, p. 8388–8396, apr 2013.
- [73] M. Honda, Y. Saito, N. I. Smith, K. Fujita et S. Kawata, “Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid,” *Optics express*, vol. 19, n°. 13, p. 12 375–12 383, 2011.
- [74] Z.-C. Zeng, H. Wang, P. Johns, G. V. Hartland et Z. D. Schultz, “Photothermal microscopy of coupled nanostructures and the impact of nanoscale heating in surface-enhanced raman spectroscopy,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, n°. 21, p. 11 623–11 631, may 2017.
- [75] O. Yeshchenko, I. Bondarchuk, V. Gurin, I. Dmitruk et A. Kotko, “Temperature dependence of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles,” *Surface Science*, vol. 608, p. 275–281, feb 2013.
- [76] K. Setoura, D. Werner et S. Hashimoto, “Optical scattering spectral thermometry and refractometry of a single gold nanoparticle under CW laser excitation,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 116, n°. 29, p. 15 458–15 466, jul 2012.
- [77] N. J. Hogan, A. S. Urban, C. Ayala-Orozco, A. Pimpinelli, P. Nordlander et N. J. Halas, “Nanoparticles heat through light localization,” *Nano Letters*, vol. 14, n°. 8, p. 4640–4645, jun 2014.
- [78] F.-Y. Kong, J.-W. Zhang, R.-F. Li, Z.-X. Wang, W.-J. Wang et W. Wang, “Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications,” *Molecules*, vol. 22, n°. 9, p. 1445, aug 2017.
- [79] D. R. Bhumkar, H. M. Joshi, M. Sastry et V. B. Pokharkar, “Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin.” *Pharmaceutical research*, vol. 24, p. 1415–1426, août 2007.
- [80] Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei et C. Burda, “Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n°. 32, p. 10 643–10 647, jul 2008.

- [81] A. M. Goodman, N. J. Hogan, S. Gottheim, C. Li, S. E. Clare et N. J. Halas, “Understanding resonant light-triggered dna release from plasmonic nanoparticles.” *ACS nano*, vol. 11, p. 171–179, janv. 2017.
- [82] F. Chen et W. Cai, “Nanomedicine for targeted photothermal cancer therapy : where are we now ?” *Nanomedicine*, vol. 10, n°. 1, p. 1–3, jan 2015.
- [83] D. K. Chatterjee, P. Diagaradjane et S. Krishnan, “Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy,” *Therapeutic delivery*, vol. 2, n°. 8, p. 1001–1014, 2011.
- [84] A. Bucharskaya, G. Maslyakova, G. Terentyuk, A. Yakunin, Y. Avetisyan, O. Bibikova, E. Tuchina, B. Khlebtsov, N. Khlebtsov et V. Tuchin, “Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles,” *Int J Mol Sci*, vol. 17, n°. 8, Aug 2016.
- [85] P. Kaur, M. L. Aliru, A. S. Chadha, A. Asea et S. Krishnan, “Hyperthermia using nanoparticles – promises and pitfalls,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 32, n°. 1, p. 76–88, jan 2016.
- [86] J. H. Kim, J. H. Kim, K.-W. Kim, M. H. Kim et Y. S. Yu, “Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity,” *Nanotechnology*, vol. 20, n°. 50, p. 505101, Dec 2009.
- [87] N. Katchinskiy, R. Godbout, A. Hatef et A. Y. Elezzabi, “Anti-EpCAM gold nanorods and femtosecond laser pulses for targeted lysis of retinoblastoma,” *Advanced Therapeutics*, vol. 1, n°. 1, p. 1800009, apr 2018.
- [88] Y. Altundal, E. Sajo, G. M. Makrigiorgos, R. I. Berbeco et W. Ngwa, “Nanoparticle-aided radiotherapy for retinoblastoma and choroidal melanoma,” *IFMBE Proc*, vol. 51, p. 907–910, 2015.
- [89] R. R. Remya, S. R. R. Rajasree, L. Aranganathan, T. Y. Suman et S. Gayathri, “Enhanced cytotoxic activity of agnps on retinoblastoma y79 cell lines synthesised using marine seaweed turbinaria ornata,” *IET nanobiotechnology*, vol. 11, n°. 1, p. 18–23, 2016.
- [90] M. Mitra, M. Kandalam, J. Rangasamy, B. Shankar, U. K. Maheswari, S. Swaminathan et S. Krishnakumar, “Novel epithelial cell adhesion molecule antibody conjugated polyethyleneimine-capped gold nanoparticles for enhanced and targeted small interfering rna delivery to retinoblastoma cells,” *Molecular vision*, vol. 19, p. 1029, 2013.
- [91] S. A. Madreperla, R. Bookstein, O. W. Jones et W. H. Lee, “Retinoblastoma cell lines y79, rb355 and weri-rb27 are genetically related.” *Ophthalmic paediatrics and genetics*, vol. 12, p. 49–56, mars 1991.

- [92] M. Busch, C. Philippeit, A. Weise et N. Dünker, “Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines,” *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 143, n°. 3, p. 325–338, oct 2014.
- [93] E. Brujan, C.-D. Ohl, W. Lauterborn et A. Philipp, “Dynamics of laser-induced cavitation bubbles in polymer solutions,” *Acta Acustica united with Acustica*, vol. 82, n°. 3, p. 423–430, 1996.
- [94] L. Xiu-Mei, H. Jie, L. Jian et N. Xiao-Wu, “Growth and collapse of laser-induced bubbles in glycerol–water mixtures,” *Chinese Physics B*, vol. 17, n°. 7, p. 2574, 2008.
- [95] D. Rioux, S. Vallières, S. Besner, P. Muñoz, E. Mazur et M. Meunier, “An analytic model for the dielectric function of au, ag, and their alloys,” *Advanced Optical Materials*, vol. 2, n°. 2, p. 176–182, dec 2013.
- [96] A. N. Bashkatov et E. A. Genina, “Water refractive index in dependence on temperature and wavelength : a simple approximation,” dans *Saratov Fall Meeting 2002 : Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV*, vol. 5068. International Society for Optics and Photonics, 2003, p. 393–396.

ANNEXE A ESTIMATION DE LA TEMPERATURE AUTOUR D'UNE NANOPARTICULE LORS DE L'IRRADIATION LASER CW

Proposer une solution médicale viable d'un point de vue clinique demande une bonne maîtrise de tous les phénomènes impliqués ainsi que de leurs éventuels effets collatéraux. C'est donc tout naturellement que nous nous sommes intéressés à la mesure de température autour d'une nanoparticule. Ces travaux n'étant toutefois pas totalement terminés, ils sont présentés ci-après comme résultats préliminaires. Comme on a pu le voir dans le Chapitre 2 : Revue de littérature, sous certaines conditions, une nanoparticule d'or sous irradiation laser peut se comporter comme un agent chauffant. Une fois le régime permanent atteint, il s'établit notamment un profil de température autour de la nanoparticule de rayon R , la température maximale se situant à la surface de la nanoparticule et décroissant en $1/R^2$ lorsque l'on s'éloigne de la nanoparticule. On peut alors observer à la fois un déplacement du pic plasmon et une diminution de la section efficace de diffusion de la nanoparticule, dépendant de la température[75]. C'est ce phénomène que nous cherchons ici à observer et à modéliser.

A.1 - Simulation numérique

La simulation numérique qui va être présentée dans cette section se base essentiellement sur les travaux de Setoura et al[76]. Par ailleurs il s'agit d'un complément au modèle NFMieProgram développé par David Rioux au sein du laboratoire, basé sur la théorie de Mie[95]. Dans un premier, temps il s'agit de modéliser la dépendance en température des fonctions diélectriques des matériaux impliqués. Les modèles de Drude et interbande servant à calculer la fonction diélectrique de l'or ont ainsi été modifiés pour tenir compte de la température de la nanoparticule sous irradiation. Le modèle se développe comme suit, les différents paramètres employés étant détaillés dans le tableau A.1. Ainsi, pour le modèle de Drude, on a :

$$\epsilon^D(\omega, T, R) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega - i\Gamma(T, R))} \quad (\text{A.1})$$

Où la fréquence d'amortissement est donnée par :

$$\Gamma(T, R) = \Gamma_{e-e-ph}(T) + A \frac{\nu_F}{R} \quad (\text{A.2})$$

Pour le modèle interbande, on se retrouve avec :

$$\epsilon^{IB}(\omega, T) = \int_{\omega_g}^{\infty} \left[\frac{\sqrt{y - \omega_g}}{y} (1 - f(y, T)) \frac{y^2 - \omega^2 + \Gamma_{ee}^2(T) - 2i\omega\Gamma_{ee}(T)}{(y^2 - \omega^2 + \Gamma_{ee}^2(T))^2 + 4\omega^2\Gamma_{e-e}^2(T)} \right] dy \quad (\text{A.3})$$

$$f(y, T) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{E_y - E_F}{k_B T}\right)} \quad (\text{A.4})$$

Tableau A.1 Liste des paramètres employés dans le modèle et valeurs choisies

Symbole	Valeur	unités	Signification
R	50	nm	rayon de la NP
ω_p	9,02	eV	pulsation plasma
A	1	-	constante d'isotropie
E_f	2,55	eV	énergie de fermi
E_g	1,8	eV	énergie du gap interbande
K	$2,65 \cdot 10^{24}$	$s^{-3/2}$	constante

Ces équations font intervenir la dépendance en température, exprimée en Kelvin, de la fréquence d'amortissement due à la diffusion électron-électron des électrons interbande :

$$\Gamma_{e-e}(T) = 2,75 \cdot 10^{14} + 5,35 \cdot 10^{10} T \quad (\text{A.5})$$

et la fréquence d'amortissement due à la diffusion électron-électron et électron-phonon des électrons de conduction, donnée par :

$$\Gamma_{e-e-ph}(T) = 6,10 \cdot 10^{11} + 2,97 \cdot 10^{11} T \quad (\text{A.6})$$

À partir de ce modèle on peut ainsi déduire la dépendance en température de la fonction diélectrique de l'or, comme montré en figure A.1.

Il est aussi possible de trouver dans la littérature la dépendance en température de l'huile (relation linéaire, fournie par le fabricant) et de l'eau[96]. Une fois ces dépendances établies, et à partir du profil de température autour d'une nanoparticule, il est possible d'appliquer la théorie de Mie à un système multi couronne, dont chaque couronne de quelques nanomètres d'épaisseur est constituée du métal ou du milieu environnant à une certaine température, à laquelle est associée la fonction diélectrique correspondante. Ainsi, on peut voir sur la figure A.2 le déplacement de pic plasmon théoriquement attendu pour une nanoparticule d'or de 100nm dans l'huile.

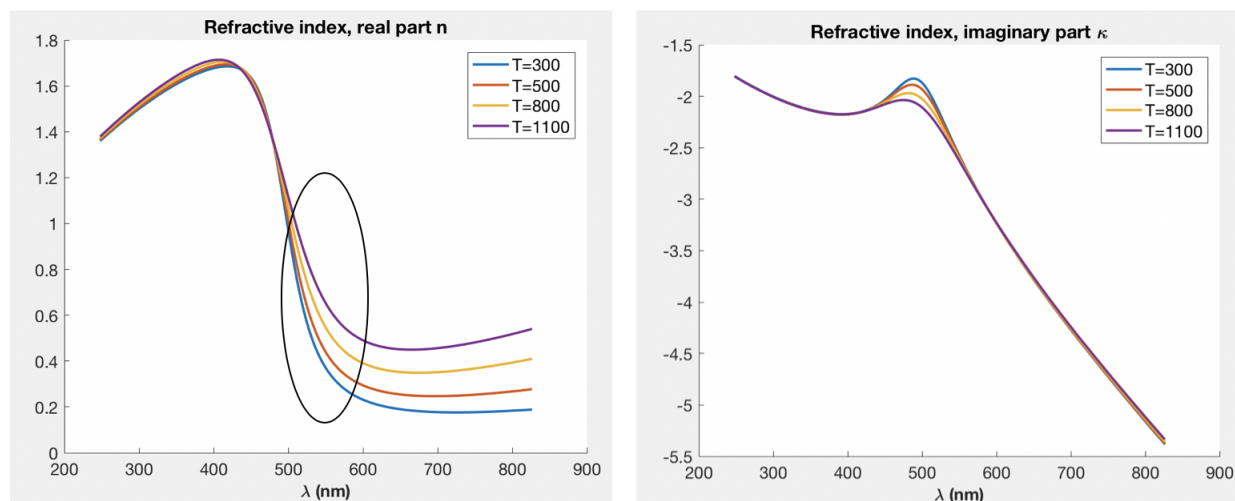


Figure A.1 Dépendance en température de la fonction diélectrique de l'or, partie réelle (gauche) et imaginaire (droite). La partie encerclée correspond au voisinage de la longueur d'onde de résonance d'une nanoparticule d'or de 100nm.

A.2 - Résultats expérimentaux

Méthode

À l'aide du spectrophotomètre par imagerie Shamrock SR750 de la compagnie *Andor Solis*, nous avons ainsi pu mesurer le déplacement du pic de diffusion de nanoparticules individuelles de 100nm provenant de chez *Nanopartz*, éclairées en rétro-diffusion et sous irradiation laser CW (Millenia Xs, 532nm, *Spectra Physics*). Grâce à un système de filtration de l'émission du laser, le spectre de la nanoparticule a pu être enregistré en direct, avant, pendant et après l'irradiation. Pour être considérée comme valide, la mesure devait permettre d'observer un déplacement du pic plasmon réversible après extinction du laser. Les résultats de ces mesures sont résumés dans la figure A.3.

Résultats

Malgré une bonne adéquation observée pour les puissances les plus faibles, nous avons été confrontés à la difficulté de mesurer des déplacements réversibles du pic plasmon de plus de quelques nanomètres. Nous étions en effet confrontés à un déplacement de la nanoparticule entraînant la fin de la mesure en direct. D'autres mesures ont également été réalisées pour des nanoparticules de 150nm et d'alliage, mais le manque d'homogénéité des échantillons utilisés ne permet pas d'en faire une exploitation fiable.

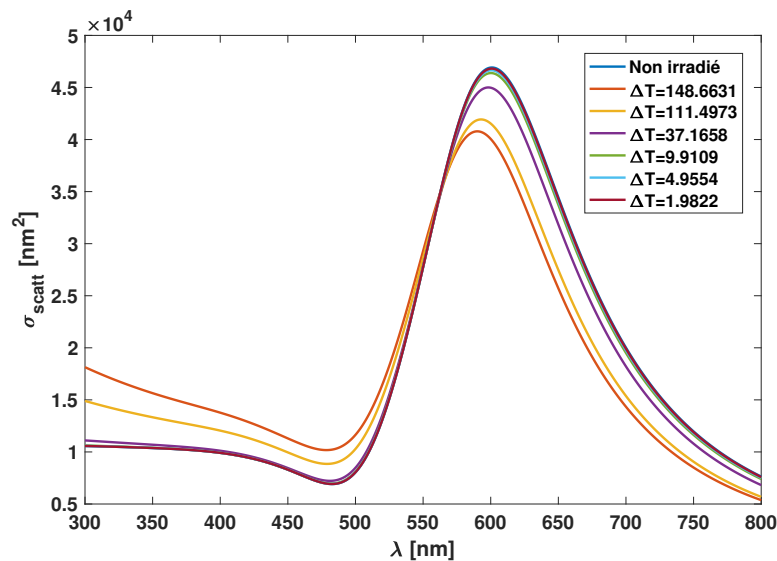


Figure A.2 Déplacement théorique du pic plasmon d'une nanoparticule d'or de 100nm dans l'huile, pour différentes températures à la surface de la nanoparticule.

A.3 - Discussion des résultats

Le modèle utilisé fait entrer en jeu de nombreux paramètres, dont quelques uns sont encore mal maîtrisés, comme l'épaisseur choisie pour les couronnes ou les différents paramètres de conduction de la chaleur (de l'huile ou à l'interface huile/métal). S'il est possible de trouver un jeu de paramètres montrant une bonne adéquation avec les premiers résultats obtenus, d'autres mesures seraient souhaitables afin de le consolider. On pourrait par exemple envisager de reproduire ces résultats pour différentes tailles de nanoparticules ou dans différents milieux (eau, air etc.). Une fois le modèle validé, il serait aussi intéressant d'appliquer le processus inverse afin de retrouver par exemple la conductivité à l'interface de nanoparticules d'alliage Au-Ag qui n'ont pas encore été caractérisées en ce sens. Pour finir, l'utilisation de sténopés plutôt que de filtres pour couper l'émission du laser au niveau du détecteur, permettrait sans doute d'améliorer la qualité des mesures.

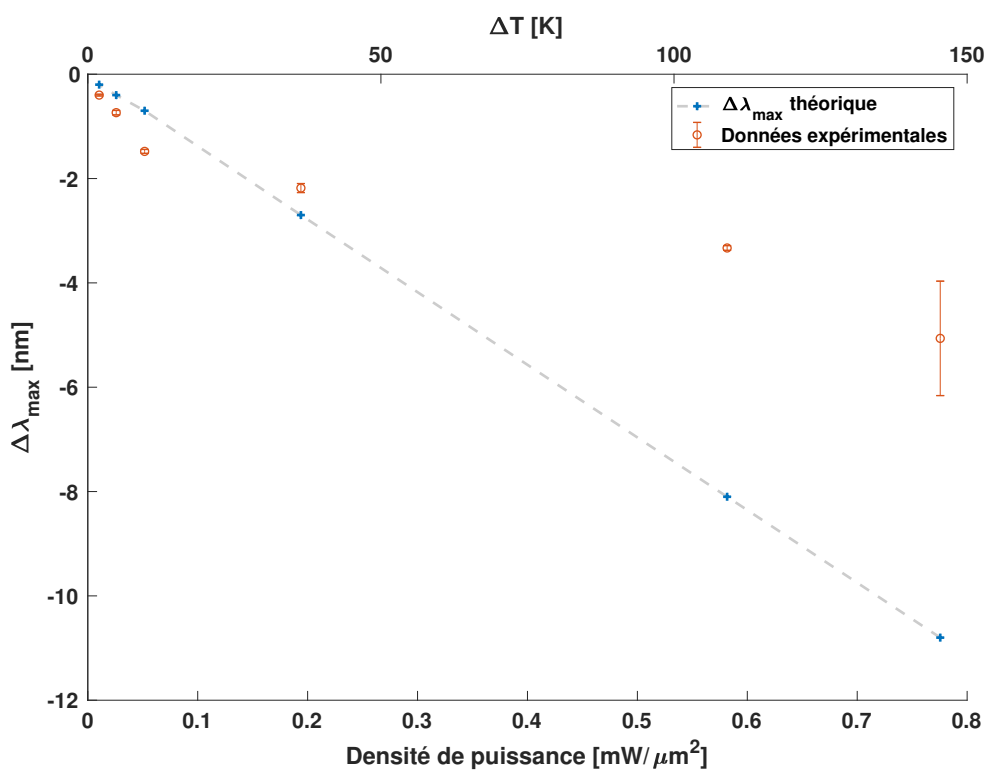


Figure A.3 Déplacement du pic plasmon observé pour des nanoparticules de 100nm dans l'huile, comparé aux valeurs théoriques, pour différentes puissances d'irradiation avec un laser CW.

ANNEXE B IMAGERIE TRIDIMENSIONNELLE D'UN AMAS CELLULAIRE APRÈS IRRADIATION

Irradiation à $0,2\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ dans le gel à 15cP - Intervalle entre deux plans : $20\mu\text{m}$ - En rouge : noyaux de cellules mortes (PI).

